SEROLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN MIT IFAT UND ELISA ZUM VERLAUF EXPERIMENTELLER TRYPANOSOMA CONGOLENSE- UND T. BRUCEI-INFEKTIONEN BEI DAHOMEY RINDERN

Elisabeth Bachthaler

Diss München
1984

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546002_0021

Aus dem Institut für Vergleichende Tropenmedizin und
Parasitologie der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Dr. h.c. J. Boch

SEROLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN MIT IFAT UND ELISA ZUM VERLAUF EXPERIMENTELLER TRYPANOSOMA CONGOLENSE- UND T. BRUCEI-INFEKTIONEN BEI DAHOMEY RINDERN

Inaugural Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians Universität München

von
Elisabeth Bachthaler
aus
Oberursel

München 1984

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. W. Leidl
Referent: Prof. Dr. Dr. h.c. J. Boch
Korreferent: Prof. Dr. D. O. Schmid

Tag der Promotion: 24. Februar 1984

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

Für meine Lieben

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

I. Einleitung..... 1

II. Serologischer Nachweis von Trypanosoma - Infektionen bei Rindern, unter besonderer Berücksichtigung homologer und heterologer Superinfektionen (anhand der Literatur)..... 2

III. Eigene Untersuchungen..... 17

A. Material und Methoden..... 17

B. Ergebnisse..... 24

1. Antikörperreaktionen im IFAT..... 24
a) nach einer Erstinfektion..... 24
b) nach einer Superinfektion..... 34
2. Antikörperreaktionen im ELISA..... 36
a) nach einer Erstinfektion..... 37
b) nach einer Superinfektion..... 44

IV. Besprechung der Ergebnisse..... 47

V. Zusammenfassung - Summary..... 56

VI. Literaturverzeichnis..... 58

I. Einleitung

Durch die Einführung neuer serologischer Testverfahren in den letzten Jahren wurden wesentliche Voraussetzungen geschaffen, um in größerem Rahmen Untersuchungen zur Epizootiologie der Rindertrypanosomiasis durchzuführen.
Die Entwicklungen auf dem Gebiet der Nachweisverfahren, insbesondere die Verbesserungen der Techniken zur Antigengewinnung, ermöglichten neue Erkenntnisse über die Problematik der Variantenbildung von Trypanosomenpopulationen sowie deren Bedeutung für Krankheitsverlauf und Immunität bei Trypanosoma- Infektionen.
Im Zusammenhang mit der Diskussion über das sogenannte Trypanotoleranzphänomen erscheint unter Feldbedingungen die Interpretation der Antikörperreaktionen infolge des permanenten Infektionsdruckes mit verschiedenen Trypanosomenspezies und -stämmen in tsetseverseuchten Gebieten zumindest schwierig.
An "trypanotoleranten" afrikanischen Dahomey- Zwergrindern, die bereits seit Generationen in Deutschland gehalten wurden und sich nie mit dem Erreger auseinandersetzen mußten, wurde das Auftreten von Antikörpern im IFAT und ELISA nach Monoinfektion mit Trypanosoma congolense und T. brucei sowie nach homologer und heterologer Superinfektion untersucht. Durch Verwendung eines klonierten T. congolense-Stammes wurde gleichzeitig versucht, verschiedene Antigenvarianten abzufangen und damit spezifische Antikörper nachzuweisen.

II. Serologischer Nachweis von Trypanosomen - Infektionen bei Rindern, unter besonderer Berücksichtigung homo - loger und heterologer Superinfektionen (anhand der Literatur).

Serologische Verfahren werden seit mehreren Jahrzehnten für die Diagnostik der afrikanischen Trypanosomiasis angewandt. Mit dem Neutralisationstest wies SOLTYS (1957) bei mit ver - schiedenen Trypanosoma Subspezies infizierten Kaninchen ab dem 5. Tag p.i. neutralisierende, lytische und protektive Antikörper nach; sie erreichten am 28. Tag p.i. ihr Maximum und blieben lebenslang erhalten; in der Agglutination traten ebenfalls ab dem 5. Tag Antikörper auf mit Maximaltitern am 12. Tag. GRAY (1960) fand bei N'Dama und Zebu - Rindern bei Mischinfektionen mit Trypanosoma vivax und T. congolense nach 21 - 39 Tagen p.i. präzipitierende Antikörper. Er stellte dabei deutliche Unterschiede der Immunreaktionen einzelner Individuen auf dasselbe Antigen fest. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch CUNNINGHAM und VICKERMAN (1962) anhand von Agglutinationstests mit Seren von mit Trypanosoma brucei infizierten Kaninchen.
Makromolekulare Identität von neutralisierenden und lytischen Antikörpern in Humanseren stellten VAN MEIRVENNE, JANSSENS und MAGNUS (1973) fest, der Beweis für ihre Zugehörigkeit zur IgM - Klasse mißlang jedoch im IFAT. AARONOVITCH und TERRY (1972) dagegen konnten nach Herstellung gereinigter IgM - Fraktionen im indirekten Test mit Kaninchenantiglobulinen nachweisen, daß es sich um IgM - Antikörper handelt.

Arbeiten verschiedener Autoren ermöglichten inzwischen eine relativ eindeutige Zuordnung der unterschiedlich wirkenden Antikörper zu ihren jeweiligen Immunglobulinklassen. Agglutinierende Eigenschaften der IgM - Fraktion erkannten HOUBA, BROWN und ALLISON (1969), SEED und Mitarb. (1969), SEED (1977), VAN MEIRVENNE und Mitarb. (1973) sowie MATTERN

und Mitarb. (1980); auch eine neutralisierende (SEED, 1977; MUSOKE und Mitarb., 1981) und protektive Wirkung (SEED und Mitarb., 1969) wird ihr zugeschrieben.
Komplementbindende Eigenschaften haben die Globuline der G - Fraktion (VAN MEIRVENNE, MOORS und JANSSENS, 1972; DIFFLEY 1978), besonders IgG_1 (KOBAYASHI und TIZARD, 1976), daneben auch protektive (SEED und Mitarb. 1969; SEED, 1977; TAKAYANAGI und ENRIQUEZ, 1973) und präzipitierende (SEED und Mitarb., 1969). Im späteren Infektionsverlauf stellten SEED und Mitarb. (1969) und SEED (1977) auch bei Antikörpern der IgG - Fraktion Agglutinations- und Neutralisationsreaktionen fest.

Uneinigkeit besteht allerdings nach wie vor über die Frage, ob die nachgewiesenen Antikörperanstiege während einer Trypanosomeninfektion auf eine spezifische Antwort auf den Erreger oder aber auf unspezifische Stimulation der Wirtsabwehr durch zirkulierende Parasiten zurückzuführen sind. An mit verschiedenen Trypanosoma brucei-Subspezies infizierten Affen stellten HOUBA, BROWN und ALLISON (1969) einen über 10fachen Anstieg der IgM - Antikörper für mehrere Monate fest; die IgG - Konzentration blieb dagegen im selben Zeitraum fast unverändert. Auch eine mehrmalige Absorption der Seren gegen den Erreger brachte keine wesentliche Abnahme der IgM - Titer; die Autoren zogen daraus den Schluß, daß es sich vorwiegend um heterophile Antikörper handeln müsse. Bei Kaninchen mit Trypanosoma equiperdum -Infektionen fanden MATTERN und Mitarb. (1980) ähnliche unspezifische Reaktionen, schlossen aber die Möglichkeit einer für die Absorption unzureichenden Antigenzubereitung nicht aus.
6 - 24facher IgM -Anstieg 2 - 3 Wochen p.i. wurde von KOBAYASHI und TIZARD (1976) bei Rindern mit T. congolense- Infektionen gemessen; dagegen waren IgG_1-Anstiege ab der 3. Woche (Maximum 7 Wochen p.i.) und IgG_2-Reaktionen nur gering ausgeprägt.Sie definierten ebenfalls den Hauptteil der IgM-Antikörper als unspezifisch.

Als Ursache für den möglichen heterophilen Ursprung wird von GREENWOOD (1974) die Bildung von Mitogenen durch den Erreger postuliert, die die B - Zellen der lymphatischen Organe zu unspezifischer Antikörperproduktion stimulieren. Polyklonale B - Zell-Stimulierung mit folgender Immunsuppression bestätigten HUDSON und Mitarb. (1975, 1976) bei Trypanosoma brucei-Infektionen von Mäusen. Von CLAYTON und Mitarb. (1979) wurde ein mitogener und immunsuppressiver Effekt an zerstörten T. brucei nachgewiesen und die Auslösung durch bestimmte Membranstrukturen für wahrscheinlich gehalten. Diese These findet Unterstützung durch SENDASHONGA und BLACK (1982), die unspezifische sowie spezifische Antikörperreaktionen in Mäusen mit T. brucei-Infektionen auf die induktive Wirkung von Fragmenten natürlich degenerierender short stumpy forms zurückführen.

Das Vorhandensein von IgM verschiedener molekularer Zugehörigkeit in Rinderseren (leichtgewichtige 7S-IgM auch bei gesunden Tieren) wird von LUCKINS (1976) im Zusammenhang mit langanhaltenden IgM-Titern bei der Trypanosomiasis und ihr möglicher verfälschender Einfluß auf die 19S-IgM - Konzentrationen erwähnt.

Bei T. gambiense-Infektionen von Kaninchen fanden SEED und Mitarb.(1969) bereits frühzeitig IgM-Anstiege, die gut mit dem Anstieg antitrypanosomaler Antikörper korrelierten, und führten langanhaltend hohe IgM-Titer wenigstens teilweise auf fortwährende spezifische Antikörperantwort auf neuauftretende Antigenvarianten zurück. Mit gereinigten IgM- und IgG-Fraktionen wies SEED (1977) bei Absorption gegen die entsprechenden Varianten deutliche Titerabfälle nach.

Bei Infektionen von Zebu- Kreuzungsrindern mit zwei verschiedenen T. brucei- Klonen stellten MUSOKE und Mitarb. (1981) in 4 von 7 Tieren mindestens 2 Antikörperpeaks fest, 8 - 10

Tage und 36 - 49 Tage p.i. mit dazwischenliegendem Titerabfall auf nahezu präinfektiöse Werte. Durch Absorption an das jeweilige Infektionsmaterial konnte die eindeutige Spezifität von IgM und IgG_1 nachgewiesen werden; IgG_2 blieb im Verlauf der Infektion unverändert. Von MORRISON, MURRAY und HINSON (1982) wird bei Infektion von Rindern mit einem T. brucei- Klon ebenfalls eine 90%ige Absorption von IgM und IgG an homologe Trypanosomen berichtet.
Im Neutralisationstest wurde von MUSOKE und Mitarb. (1981) für den ersten Antikörperpeak eine 10x stärkere Bindungskapazität von IgM gegenüber IgG_1 gefunden; diese wiesen jedoch im zweiten peak eine 20fach gesteigerte und damit 5x grössere Bindungskapazität auf als die gleichbleibende der IgM- Fraktion. Eine polyklonale B - Zell-Stimulierung wird aufgrund dieser Ergebnisse von den Autoren eindeutig zurückgewiesen; vielmehr lassen sich die entsprechenden Antikörperreaktionen einer spezifischen Primär- und anamnestischen Sekundärantwort auf möglicherweise wiederholt auftretende Trypanosomenvarianten zuordnen.
Deutliche Korrelation von IgM- und IgG- Titerschwankungen und auftretenden Antigenvarianten bei T. congolense-Infektionen von Rindern fanden auch MASAKE, MUSOKE und NANTULYA (1983). TABEL und Mitarb. (1981) konnten während T. vivax-Infektionen bei Rindern trotz mehr als dreifacher IgM- Anstiege kein signifikantes Ansteigen heterophiler Antikörper feststellen.

Für vergleichende Untersuchungen immunologischer Reaktionen ist eine möglichst umfassende Standardisierung der Versuchsbedingungen Vorraussetzung. Grundlage dafür ist neben der Zuordnung der Antikörperkompetenzen die Definition der verwendeten ANTIGENE und ihre antigenetische Wirkung.

Eine Einteilung trypanosomaler Antigene wurde von WEITZ (1960) vorgenommen. Er stellte den sogenannten Exoantigenen, die auch im Serum infizierter Tiere vorkommen und agglutinierende und präzipitierende Eigenschaften aufweisen, zellgebundene Antigene gegenüber, die erst nach Zerstörung der Trypanosomen freiwerden. Mit Hilfe fluoreszierender Antikörper fand er eine Speziesspezifität des Exoantigens, wobei besonders bei T. brucei häufig und nur nach Inkubation mit homologem Antiserum deutliche Fluoreszenz der undulierenden Membran auftrat; dies spricht für eine hohe Besatzdichte mit Exoantigen. Durch Untersuchungen von Eltern- und Nachfolgepopulationen fanden sich Hinweise auf antigenetische Veränderungen des Exoantigens im Verlauf einer Infektion.
Antiseren gegen das "bound" Antigen zeigten jedoch sowohl gegen homologe als auch gegen heterologe Trypanosomen Fluoreszenz, sodaß eine den Spezies gemeinsame Antigenität angenommen werden konnte, das "common antigen" (Weitz,1963).

VICKERMAN (1969) gelang der Nachweis eines sogenannten "surface coat", einer homogenen, elektronendichten 12 - 15nm dicken Schicht außerhalb der eigentlichen Zellmembran bei Blutformen verschiedener Trypanosomenspezies, der bei toten Trypanosomen und nach Einwirkung proteolytischer Enzyme abgelöst wird. Ein charakteristisches, prädominierendes Glykoprotein wurde von ALLSOPP, NJOGU und HUMPHREYS (1971), LANHAM und TAYLOR (1972) sowie CROSS (1975) als Hauptkomponente des surface coat isoliert. 5 - 10 Millionen Moleküle dieses Oberflächen- Glykoproteins mit einem Molekulargewicht von 65000, ca. 600 nach außen gerichteten Aminosäure- Bausteinen und ungefähr 20 Zuckerkomponenten, die der Zellmembran zugewandt sind und vermutlich eine wesentliche Rolle bei der Anheftung des coats spielen,bilden einen dichten Mantel um jede Trypanosomenzelle (BORST und CROSS, 1982).

Die Funktion des surface coat, der erst bei metazyklischen Formen ausgebildet ist, wird in erster Linie als Schutzmechanismus der Trypanosomenblutformen gegenüber der Wirtsabwehr gedeutet (CROSS, 1977). In Versuchen mit klonierten Trypanosoma brucei gelang CROSS (1975) die Zuordnung eines antigenetisch spezifischen Glykoproteins zur jeweiligen homologen Population (= Variant Specific Glycoprotein, VSG). Durch Änderung der außenliegenden Aminosäure- Sequenzen können Trypanosomen sich den jeweils gebildeten spezifischen Antikörpern entziehen und sich so ein dauerhaftes Überleben in ihren Wirten sichern (BARBET, DAVIS und MCGUIRE, 1982). Dadurch wird den variantenspezifischen Oberflächenantigenen (VSSA) eine wesentliche Rolle im immunologischen Geschehen zugesprochen.

Die neben den VSSA's in allen Stadien des Trypanosomenzyklus vorkommenden und sämtlichen Spezies, Stämmen und Varianten gemeinsamen common Antigene besitzen dagegen keine agglutinierenden und protektiven Eigenschaften; sie stellen nach SEED (1974) vermutlich Strukturproteine der Zellmembran oder zytoplasmatische Enzyme dar.

Bereits nach 5 Stunden bis 2 Tagen p.i. wurden von DIFFLEY und HONIGBERG (1977, 1978) und DIFFLEY (1978) bei T. congolense und T. brucei- Infektionen wirtsspezifische Plasmaproteine(IgG, Albumin und C_3) an der gesamten Trypanosomenoberfläche festgestellt, sogenannte "host specific antigens". Ihr frühes Auftreten und Erscheinen auch bei immundefizienten Tieren schließen eine immunologische Reaktion aus; eher werden mögliche membranstabilisierende und Stoffwechselfunktionen diskutiert. Von besonderem Interesse für die Pathogenese der Trypanosomiasis scheint die These eines "antigenic mimicry", bei dem durch Bindung wirtseigener Plasmaproteine an immunogene Parasitendeterminanten eine Tolerierung des Erregers erreicht wird.

Interaktionen zwischen Antikörpern und Trypanosomenantigenen werden von vielen Autoren als Auslöser für die ANTIGENVARIANZ gesehen, wobei den Antikörpern eher selektive als induktive Wirkung zugesprochen wird. Nach BORST und CROSS (1982) kann jede einzelne Trypanosomenzelle mehr als 100 VSG's herstellen, die so verschieden sind, daß spezifische Antikörper nur mit jeweils einem der VSG's reagieren können. Diese Fähigkeit ist auf ein einheitliches Genrepertoire zurückzuführen.
CROSS (1975) nimmt an, daß die durch Bildung eines Antigen-Antikörper- Komplexes bewirkte Ablösung des surface coat ein Signal für den Zellkern darstellt, ein neues VSG zu programmieren. Damit ist das Überleben des Einzelerregers abhängig von der Schnelligkeit des Umschaltens auf ein neues Gen und der Antikörperproduktionsrate des Wirts.
Ähnliche Mechanismen sieht VICKERMAN (1978), der allerdings die Möglichkeit der Ausbildung eines antigenetisch neuen VSG durch denselben Erreger in Frage stellt. Vielmehr nehmen DOYLE (1977) und VICKERMAN (1978) die Existenz von Heterotypen in jeder Population an,deren Häufigkeit und Vermehrungsgeschwindigkeit (1 pro 10^4 Homotypen) mit dem Auftreten neuer Varianten und Parasitämiepeaks korreliert, sodaß die Population auf Kosten von 99,9% einzelner Trypanosomen überlebt.

Im IFAT lassen sich in Abhängigkeit der Versuchsbedingungen verschiedene Antigene nachweisen. Das Prinzip des IFAT beruht auf dem Nachweis spezifischer antitrypanosomaler Antikörper. Ganze Trypanosomen werden dabei mittels unterschiedlicher Techniken auf Objektträger gebracht und mit verschiedenen Verdünnungsstufen infizierter Seren inkubiert. Sofern spezifische Antikörper im Wirtsserum vorhanden sind, werden sie durch erneutes Inkubieren mit einem gegen diese Antikörper gerichteten fluoreszeinmarkierten Antiglobulin sichtbar gemacht. Entsprechend der Konzentration wirtseigener Antikörper läßt sich Fluoreszenz bei steigenden Verdünnungen nachweisen.

Welche Antigene im IFAT wirksam sind, wird von einzelnen Autoren unterschiedlich beurteilt; so konnten von WILSON, CUNNINGHAM und KIMBER (1966) nur common antigens gegen Trypanosoma brucei, T. congolense und T. vivax festgestellt werden. Auch ASHKAR und OCHILO (1972) fanden bei ihren Untersuchungen mit dünnen Blutausstrichen luftgetrockneter bzw. in 0,01n HCl fixierter Trypanosoma brucei Kreuzreaktionen mit Seren verschieden infizierter Rinder. Homologe Reaktionen waren zu 100% positiv, Seren von Tieren mit T. congolense- oder T. vivax- Infektionen zeigten zu 84 - 88% positive Ergebnisse. Luftgetrocknete Blutausstriche der 3 Trypanosomenarten untersuchten auch ZWART und Mitarb. (1973) vergleichend mit verschiedenen Fixierungstechniken. Die Befunde mit 5%igem Formalin, 0,3%igem Eisessig, 0,01n und 0,03n HCl waren zufriedenstellend, als beste Methode erwies sich die 5minütige Acetonfixierung. Dabei zeigten sowohl homologe als auch heterologe Seren infizierter Rinder, Schafe und Ziegen deutliche Fluoreszenz, allerdings traten unterschiedliche Titerdifferenzen zwischen den einzelnen Spezies bei allen Tierarten auf. Einige Seren zeigten nur speziesspezifische Fluoreszenz, andere Seren monoinfizierter Tiere fluoreszierten mit allen 3 Trypanosomenarten. T. congolense und T. vivax ergaben mit homologen Seren deutlich höhere Titer, T. brucei- Seren dagegen reagierten mit T. brucei- und T. congolense- Antigen gleich.
LATIF und ADAM (1973) verwandten blutzellfreie Trypanosomen in Pferde- oder Rinderserum nach 15minütiger Formalinfixierung zur Differenzierung von T. brucei-Subspezies. Mit Antigen von 14 T. brucei-,4 T. rhodesiense-,3 T. gambiense- und 4 T. congolense- Stämmen konnten sie bei 368 Kreuztitrationen mit Ratten- und Kaninchen- Seren 4x höhere Titer gegen homologe als gegen heterologe Trypanosomen nachweisen. Eine Behandlung der Tiere hatte keinen Einfluß auf die Spezifität.

Luftgetrocknete, blutzellfreie unfixierte T. brucei, T. congolense und T. vivax untersuchten HÖRCHNER, BOFENSCHEN und ZANDER (1979) mit Kaninchenseren. Mit verschiedenen Chargen desselben Antigens konnten unterschiedliche Reaktionen mit demselben homologen Serum festgestellt werden. Daneben war eine deutliche Speziesspezifität nachweisbar. Heterologe Antikörpertiter von T. congolense- Infektionen waren gegen T. brucei Antigen nur um eine Stufe unter derjenigen der homologen geblieben, Titer von T. brucei- Antikörpern gegen T. congolense- Antigen zwei Stufen niedriger als die homologen. T. vivax zeigte generell die geringste Antigenität, T. congolense die stärksten Reaktionen.

VAN MEIRVENNE, JANSSENS und MAGNUS (1975) gelang an Blutausstrichen klonierter Trypanosoma brucei nach Hitzefixierung sogar die Unterscheidung verschiedener Antigenvarianten; dabei hoben sich homologe Trypanosomen durch deutlichere Fluoreszenz auch größenmäßig von den umgebenden heterologen Varianten ab. Bei stärkerer Verdünnung der Antiseren trat eine auf die undulierende Membran beschränkte, granulär strukturierte Fluoreszenz auf, wie sie ähnlich schon von WEITZ (1963) berichtet wurde.

NANTULYA und Mitarb. (1979) stellten mit Hilfe des IFAT an klonierten, in 1%igem Formalin fixierten T. brucei das Wiederauftreten einer Antigenvariante während eines späteren Infektionsstadiums fest.
Dagegen ließen nach dem mit Parasitämieschwankungen korrelierten Auftreten von zwei Antikörperpeaks 1 und 2 Wochen p.i. bei Rindern mit Trypanosoma congolense- Infektionen darauffolgende gleichbleibende Titer trotz weiterer Parasitenschübe nach Meinung von LÖTZSCH und DEINDL (1974) schließen, daß nur common antigens und keine VSSA's im IFAT nachweisbar sind.

Für Untersuchungen von Titerverläufen im IFAT diente, sofern keine anderen Angaben gemacht werden, als Konjugat jeweils tierartspezifisches Anti- Gammaglobulin.

Bei Monoinfektionen afrikanischer Zebus mit verschiedenen Trypanosomenspezies traten erste Antikörper gegen das homologe Antigen 8 - 21 Tage p.i. auf (Titer 1:40 - 1:80). Nur bei Vorhandensein zirkulierender Trypanosomen waren kontinuierliche Titeranstiege mit vereinzelten Fluktuationen bis 100 Tage mit Maxima von 1:80 (2 Stufen) bis 1:1280 (6 Stufen) nachweisbar, die bis zum Tod der Tiere unverändert blieben. Waren die Titer nach 6 - 8 Wochen wieder abgefallen, wurde eine Selbstheilung der Tiere angenommen. Rapider Titerabfall konnte nach Behandlung einiger Rinder mit Berenil beobachtet werden.
In Vergleichen gegen heterologe Antigene kamen nie höhere Titer als 1:40 zustande (WILSON und CUNNINGHAM, 1971).

Bei sofortiger Berenil therapie nach T. congolense, T. vivax- und T. brucei- Infektionen konnten bei Rindern (Bos indicus) von WILSON und Mitarb. (1976) im IFAT keine antitrypanosomalen Antikörper nachgewiesen werden. Evtl. erforderliche Therapie von Einzeltieren führte zu geringen Antikörper-Titern vom 3. - 29. Monat p.i., nach Reinfektion 2 Jahre später zeigte sich eine deutliche Immunität der Tiere. Unbehandelte Kontrollen wiesen ab dem 3. Monat p.i. Antikörper auf, deren Titer auf 1:640 bis 1:1280 im 6. Monat anstiegen und, sofern die Tiere überlebten, auch dauerhaft erhöht blieben.

Positive Korrelationen zwischen Parasitämie und Antikörperbildung wurden auch von SCHINDLER und SACHS (1970) nach Infektion von Beagle- Hunden mit T. brucei festgestellt; dagegen waren Titereinbrüche trotz zweimaliger Behandlung mit Berenil nicht zu erkennen.

Durchschnittstiter mehrerer Zebu- Kreuzungsrinder mit Monoinfektionen verschiedener Trypanosomenspezies erstellten MEHLITZ und DEINDL (1972). Dabei stiegen die Antikörper - konzentrationen mit T. brucei und T. congolense infizierter Tiere rapide an, allerdings bleiben die Titer gegen T. congolense mit 1:160 bis 1:320 während der gesamten Infektion bis zum Tod nach 100 Tagen deutlich unter denen der mit T. brucei infizierten Rinder (1:160 - 1:1280).
Titer gegen heterologes Antigen blieben wiederum 2 - 3 Stufen niedriger.

PERIE, TINNEMANS-ANGGAWIDJAJA und ZWART (1975) infizierten Kälber mit T. brucei bzw. T. congolense. Bei T. brucei erfolgte ein Titeranstieg ab dem 10. Tag um 5 Stufen auf 1:2560 am 30. Tag; er blieb auf gleicher Höhe bis zum Tod des Tieres nach 80 Tagen bestehen. Nach einer Infektion mit T. congolense traten Titer etwas früher auf mit einem ersten, kurzen peak von 1:640 am 12. Tag, einem zweiten zwischen dem 40. und 50. Tag (bis 1:1280) und schwankendem Verlauf (1:160 bis 1:320) bis zum Tod nach 90 Tagen.
Nach Abklingen der Parasitämie und nach Therapie fielen die Antikörperkonzentrationen.
Dagegen fand MEHLITZ (1975) bei schwarzbunten Kälbern nach T. congolense- oder T. brucei- Infektionen serologisch nachweisbare Reaktionen bis 145 bzw. 210 Tage nach der letzten Parasitämie. Bei einer T. brucei- Infektion traten erste Titeranstiege bereits am 6, - 9. Tag auf, Maxima von 1:1280 bis 1:2560 wurden vor dem 50. Tag erreicht und blieben bis zu 450 Tagen bestehen. Bei T. congolense- Infektionen erschienen Antikörper erst nach 14 bis 28 Tagen, die Titer stiegen langsam auf 1 1280 bis 1:2560 am 80. Tag und fielen auf 1:160 nach 400 Tagen ab.

Auch von WILSON und CUNNINGHAM (1972) wird ein verspäteter Antikörperanstieg nach T. congolense- Infektionen von Zebus

berichtet. Wechselnden Titern (1:80 - 1:320) folgte ein stufenweiser Abfall bis 360 Tage p.i.

Von MEHLITZ (1975) wurden schwarzbunte Kälber nach 80 - 450 Tagen mit verschiedenen Trypanosomenarten superinfiziert und die serologischen Reaktionen gegen homologe und heterologe Antigene geprüft. Superinfektion mit T. congolense nach 450 Tagen eines mit T. brucei erstinfizierten Rindes ließ nur gegen das homologe (T. congolense) Antigen eine rapide Titerzunahme auf 1:640 erkennen, allerdings waren die Titer gegen T. brucei- Antigen der Erstinfektion unverändert hoch auf 1:640. Superinfektion mit T. vivax auf T. congolense nach 250 Tagen hatte ebenfalls einen rapiden Titeranstieg gegen T. vivax-Antigen zur Folge, gegen T. congolense- Antigen war er nur kurzfristig.
Nach Superinfektion von T. brucei auf T. vivax folgte nur ein deutlicher Anstieg gegen das homologe T. brucei- Antigen. Eine zweite Superinfektion dieser Tiere mit T. congolense verursachte keine erkennbare Antikörperstimulation mehr.
POLITZAR (1974) fand nach Infektion von Rindern mit T. vivax oft nur geringe Unterschiede zwischen homologen und heterologen (T. brucei, T. congolense) Reaktionen.
Bei einer Superinfektion mit T. brucei nach 28 Tagen stiegen zwar die Titer gegen T. brucei- Antigen um 2 - 3 Stufen an, blieben aber immer noch unter denen gegen T. vivax.
Nach Simultaninfektion mit allen 3 Spezies traten im Vergleich zu Monoinfektionen früher serologische Reaktionen auf; die Titer blieben aber niedriger. Obwohl dabei T. congolense die höchste Parasitämie verursachte, wurden gegen T. congolense- Antigen deutlich geringere Titer gemessen als gegen T. brucei oder T. vivax. Dieser Befund und die Ergebnisse anderer Autoren weisen daraufhin, daß T. congolense zumindest im IFAT die geringste Antigenität besitzt.

Infektionen mit T. brucei führten bei Dahomey- Rindern zu 8 - fachen Anstiegen der IgM- Serumspiegel; im IFAT waren ab der 3. Woche p.i. bleibende Titer nachweisbar (VAN MEIRVENNE, MOORS und JANSSENS, 1972).
Bei Untersuchungen an Dahomey und verschiedenen anderen Rinderrassen im Verlauf von Erst- und Reinfektionen mit Trypanosoma congolense zeigten reinfizierte Dahomeys bereits nach 7 Tagen erste IgM- und IgG- Titer mit Anstiegen um maximal 4 Stufen, wobei die IgM- Konzentrationen früher abfielen als die bis zu einer Bereniltherapie nach 44 bzw. 101 Tagen bleibend hohen IgG- Titer. Ein erstinfiziertes Dahomey wies zwar erst nach 12 Tagen Antikörperreaktionen auf, IgM- und IgG- Titer stiegen dafür bis zu 7 Stufen an.
Bei erst- und reinfizierten Schwarzbunten war die Immunantwort wesentlich geringer ausgeprägt. Reinfizierte Tiere zeigten ab dem 10. bzw. 14. Tag Titeranstiege um 1 - 2 Stufen. Bei einem erstinfizierten Tier waren bereits am 7. Tag IgM nachweisbar, die Titer erreichten jedoch nur Werte von 1:256 (4 Stufen). IgG- Titer blieben bei maximal 1:128 und traten erstmals nach 14 Tagen auf (WILLBERG, 1983).

Ähnlich dem IFAT beruht auch der ELISA auf dem Prinzip der Sichtbarmachung spezifischer Antigen- Antikörperreaktionen im Serum infizierter Tiere. Während bei seinem Vorläufer, dem Immunperoxidase- Test wie im IFAT ganze Trypanosomen als Antigen dienen, wird beim ELISA lösliches Trypanosomenhomogenat an eine feste Phase gekoppelt, mit Serum inkubiert; bei Vorhandensein von Antikörpern tritt nach Zugabe von enzymmarkiertem Antiglobulin und Substrat eine durch enzymatischen Umsatz des Substrats bedingte Farbreaktion auf, die meist photometrisch ausgewertet wird.

In einer vergleichenden WHO- Studie von 1976 wurde eine 90%ige Übereinstimmung von IFAT und ELISA bei der Untersuchung positiver und negativer Patientenseren festgestellt. Dabei wurden für den IFAT unfixierte dünne Blutausstriche, für den ELISA der abzentrifugierte Überstand blutzellfreier, ultraschallzerstörter T. brucei als Antigen zugrundegelegt. Eine Sensibilitätsprüfung des Antikörpernachweises bei behandelten und unbehandelten Patienten ließ im ELISA keine Unterschiede erkennen, im IFAT allerdings war eine deutliche Abnahme positiver Ergebnisse zu verzeichnen.

Da der ELISA erst seit wenigen Jahren Eingang in die Diagnostik der Rindertrypanosomiasis gefunden hat, liegen mir nur wenige Berichte dazu vor.
LUCKINS und MEHLITZ (1978) untersuchten bei Zebus und N'Dama unterschiedlicher Herkunft mit IFAT und ELISA Antikörperreaktionen gegenüber homologem und heterologem Antigen. Gemischte Blutausstriche mit T. brucei, T. vivax und T. congolense wurden vor Gebrauch in 0,3%igem Eisessig fixiert, im IFAT wurde Rabbit- anti- Bovine FITC Konjugat verwendet, im ELISA RaB AP Konjugat und blutzellfreies lösliches Trypanosomenprotein als Antigen.
Im IFAT traten mehr positive Reaktionen gegen T. vivax und T. congolense auf als gegen T. brucei, im ELISA dagegen waren nur geringe Titerunterschiede zwischen den einzelnen Spezies bemerkbar. Generell zeigten die Zebus stärkere Antikörperreaktionen als die N'Dama.

Beim Vergleich von 3 Trypanosoma- Antigenen stellte LUCKINS (1977) für T. congolense die schwächste Antigenität gegenüber gleichstarker von T. brucei und T. vivax fest.
Bei Zebus und Friesenrindern untersuchte er IgG- Reaktionen nach Mono- und Superinfektionen im ELISA. Erste Antikörper konnten bei allen Tieren innerhalb von 14 Tagen entdeckt werden.

Sowohl nach Erst- als auch nach Superinfektionen mit ein oder zwei Trypanosomenspezies machten sich deutliche individuelle Unterschiede bemerkbar; während bei einem der Rinder nach der Erstinfektion mit T. vivax geringgradige Titeranstiege erst am 95. Tag festzustellen waren, fielen sie trotz einer Superinfektion mit T. brucei weiterhin ab und begannen dann 40 Tage später anzusteigen.
Ein zweites Tier zeigte bereits nach der Erstinfektion enorme Antikörperzunahmen, die langsam bis zum Tag der Superinfektion zurückgingen, um dann in deutlicher Beziehung zur Parasitämie erneut anzusteigen.
Nach einer Drittinfektion mit T. congolense waren bei keinem der Tiere damit verbundene serologisch nachweisbare Reaktionen erkennbar.

Die Untersuchungen von WILLBERG (1983) an verschiedenen Rinderrassen mit T. congolense- Infektionen zeigten im ELISA mit Trypanosomen- Extraktantigen eine stärkere Sensibilität des Tests gegenüber dem IFAT. Erste IgM- Nachweise gelangen bei allen Tieren bereits 3 - 14 Tage p.i.; auch wurden mit 5 - 6 Titerstufen bei vielen Tieren höhere Konzentrationen gemessen.2 - 3 Wochen p.i. stiegen auch IgG- Antikörper rapide an und erreichten Maximaltiter von bis zu 1:2048 (6 Stufen).
Hohe IgM- Titer im Verlauf der Infektion schienen außerdem auf das Auftreten später gebildeter Variantenpopulationen hinzuweisen.

III. Eigene Untersuchungen

A. Material und Methoden

6 Dahomey (D_4- D_9) und 3 Schwarzbunte (S_4- S_6) dienten in drei aufeinanderfolgenden Experimenten über einen Zeitraum von insgesamt 186 Tagen als Versuchstiere. Die Rinder waren verschieden alt und unterschiedlichen Geschlechts (Tab. 1). Sie wurden während des gesamten Versuches unter gleichen Bedingungen im Anbindestall gehalten und erhielten Heu und Kraftfutter sowie Wasser ad libitum.

Rind Nr.	Rasse	Alter (Jahre)	Geschlecht
D_4	Dahomey	6	w
D_5	Dahomey	3	w
D_6	Dahomey	2	w
D_7	Dahomey	9	w
D_8	Dahomey	5	w
D_9	Dahomey	3	m
S_4	Schwarzbunt	1	w
S_5	Schwarzbunt	1	w
S_6	Schwarzbunt	1	m

Tab. 1: Aufstellung der Versuchsrinder nach Rasse, Alter und Geschlecht

Als Infektionsmaterial dienten Trypanosoma brucei, Laborstamm Hamburg, der als Stabilat Nr. 9 bei -80 bzw. -196° C im Institut gehalten wird und der klonierte T. congolense- Stamm Tc 423, Klon O, der 1977 im Institut für Veterinär- Biochemie der FU Berlin durch Übertragung von Einzelzellen auf letal bestrahlte Mäuse gewonnen und seit Jan. 1983 in unserem Institut bei -196° C als Stabilat Nr. 134 aufbewahrt wurde.

In einer ersten Versuchsphase von 113 Tagen wurden die Dahomeys mit Trypanosoma congolense oder T. brucei (als blutzellfreie Suspension in 2 ml PSG) in Schulterhöhe subkutan beimpft. Nach Ablauf von 113 Tagen erfolgte eine homologe oder heterologe Superinfektion. Dabei wurden die Schwarzbunten als Kontroll- und Vergleichstiere mit T. congolense erstinfiziert (Tab. 2).

Rind Nr	Erstinfektion Erreger	Dosis	Superinfektion Erreger	Dosis
D_4	T. cong.	$2{,}3 \times 10^5$	T. brucei	$4{,}8 \times 10^5$
D_5	T. cong.	$2{,}3 \times 10^5$	-	-
D_6	T. cong.	$2{,}3 \times 10^5$	T. cong.	$4{,}0 \times 10^5$
D_7	T. brucei	$6{,}0 \times 10^5$	T. cong.	$4{,}0 \times 10^5$
D_8	T. brucei	$6{,}0 \times 10^5$	T. brucei	$4{,}8 \times 10^5$
D_9	-	-	-	-
S_4	-	-	T. cong.	$4{,}0 \times 10^5$
S_5	-	-	T. cong.	$4{,}0 \times 10^5$
S_6	-	-	-	-

Tab. 2: Aufstellung von Infektionsmaterial und Infektionsdosis bei Erst- und Superinfektionen verschiedener Rinder mit Trypanosoma congolense und T. brucei

Eine zweite Superinfektion mit je $4{,}4 \times 10^5$ T. brucei wurde 158 Tage nach der Erstinfektion bzw. 45 Tage nach der Zweitinfektion bei den Rindern D_4, D_6 und D_8 vorgenommen.

Zur Anzüchtung und Vermehrung der Trypanosomen verwendete ich NMRI- Mäuse (30 - 35g) und weiße Ratten (180 - 250g) beiderlei Geschlechts aus institutseigener Zucht. Die Tiere wurden unter gleichen Bedingungen in Makrolonkäfigen gehalten und erhielten Altromin- Standarddiät und Wasser ad libitum. Mindestens 12 Stunden vor Beimpfung mit Trypanosomen erfolgte eine Röntgenbestrahlung mit letaler Dosis von 857 rad (10 min, 85,7 rad/min).

Für die Gewinnung von Trypanosomen zur Antigenherstellung wurden in den ersten vier Wochen nach der Erstinfektion bzw. in den ersten zwei Wochen nach der Superinfektion von allen Rindern täglich, später 3 x wöchentlich, Blutproben auf Parasiten untersucht.Dabei vermehrte ich von den Rindern D_4 - D_6 vom ersten und zweiten Parasitenpeak Trypanosomen in Mäusen und verarbeitete sie bei maximaler Parasitämie zu Stabilat. Ich versetzte je 0,5 ml hochparasitämisches Blut mit der gleichen Menge einer Mischung aus 30% Glycerin und 70% physiologischer Kochsalzlösung, brachte dies in 2 ml Glasampullen durch 40 minütiges gradweises Herunterkühlen (mit Trockeneis im Methanolbad) auf -40° C und bewahrte es bei -80° C bis zur Weiterverwendung auf.
Von D_7 und D_8 stellte ich nur vom 2. Parasitenpeak Stabilate her, da der erste zu gering ausgeprägt war. Während von D_4 außerdem noch ein drittes Stabilat von einem später im Infektionsverlauf aufgetretenen peak gewonnen werden konnte, mißlangen mehrmalige Anzüchtungsversuche der Trypanosomen von D_5 und D_6 am 50., 65. und 90. Tag der Erstinfektion.
Nach der Superinfektion war nur bei D_7 eine deutliche Parasitämie ausgeprägt; von dem stärksten peak stellte ich ein weiteres Stabilat her.

Die Trennung von Trypanosomen und Blutbestandteilen erfolgte in Anlehnung an WILLBERG (1983) nach der Methode von LANHAM

und GODFREY (1970). Als Trennmedium diente vorgequollene DE 52 Zellulose der Fa. Whatman, England. Äquilibrieren und Spülen der Säule führte ich entsprechend den Angaben der Fa. Whatman durch mit einem Phosphatpuffer- Glukose- Gemisch (PSG, pH 8) der Zusammensetzung $Na_2 HPO_4 \times 2 H_2O$: 10,14 g; $Na H_2PO_4 \times H_2O$: 0,41 g; Na Cl 2,55 g; Glucose x H_2O: 11,0 g ad 1 l aq. dest.
Die Säulen mit einem Durchmesser von 6 cm wurden entsprechend der Blutmenge gepackt; als untere Begrenzung verwendete ich reine Seide, den oberen Abschluß bildete Filterpapier mit einer Porendichte von 240 nm.
Als Richtwert diente 60 g Zellulose pro 10 ml Blut.
Nach der Beschickung mit Blut spülte ich die Säulen 2 - 3 Stunden mit PSG pH 8 und wusch das Eluat anschließend dreimal durch 20 minütige Kühlzentifugation (4° C, 2500 g) und erneutes Aufschwemmen in PSG. Die Weiterverarbeitung der Trypanosomen erfolgte gemäß den Anforderungen der jeweiligen Verwendungszwecke.

Zur Serumgewinnung wurde den Rindern in den ersten 4 Wochen p.i. täglich, danach 3 x wöchentlich Blut aus der Vena jugularis entnommen. Zur Gerinnung blieb es einige Stunden bei Zimmertemperatur stehen, wurde dann 10 min bei 1300 g abzentrifugiert und in Portionen zu 100 µl in Eppendorf- tubes bei -25° C gelagert.

Für den IFAT erfolgte die Antigenherstellung nach der Methode von NANTULYA und DOYLE (1977). Dazu wurden jeweils 1 ml gewaschene, in PSG aufgeschwemmte Trypanosomen mit 9 ml 0,1%igem Formalin in PBS- Puffer, pH 7,2 gemischt, einige Tage bei 4° C im Kühlschrank aufbewahrt und mehrmals täglich leicht geschüttelt. Daraufhin trennte ich durch 10 minütiges Kühlzentrifugieren (4° C) bei 350 g die Trypanosomen vom Überstand und wusch sie durch dreimaliges Aufschwemmen in PBS und Abzentrifugieren. Den Trypanosomenpellet verdünnte

ich mit PBS so, daß auf einem Objektträger bei 40-facher Vergrößerung 20 - 30 Parasiten sichtbar waren. Mit dieser Suspension wurden spezielle IFAT- Objektträger der Fa. Hölzel beschichtet, über Nacht luftgetrocknet, am nächsten Tag paarweise in Seidenpapier gewickelt und mit Kieselgel luftdicht in Plastiktüten bei -25°C aufbewahrt.

Den Test führte ich nach einer Modifikation von CAMARGO (1966) durch. Als Konjugate dienten RaB/IgM (Fc) der Fa. Nordic, Niederlande und RaB/IgG (heavy and light chains) der Fa. Cappel, USA.
Die zu untersuchenden Rinderseren verdünnte ich mit PBS-Puffer (pH 7,2) 1:16 - 1:2048 und brachte je 10 µl auf die entsprechenden antigenbeschichteten Felder der Objektträger auf. Nach 45 minütiger Inkubation bei 37°C in der feuchten Kammer spülte ich das überschüssige Serum mit Leitungswasser ab, wusch die Objektträger 3 x 5 Minuten in frischem PBS und trocknete sie mit Filterpapier. Daraufhin tropfte ich je 10 µl Konjugat der Verdünnung 1:20 auf und inkubierte und wusch erneut. Nach dem Trocknen wurden die Objektträger mit Glycerin- PBS (pH 7,6 - 8) eingedeckelt und im Fluoreszenzmikroskop bei der Filterkombination I 2 Blau im Auflicht mit 6,3 x 40-facher Vergrößerung ausgewertet. Als positiv galten alle Verdünnungsstufen, bei denen wenigstens 50% der Trypanosomen gelb- grün fluoreszierten.

Die Seren aller Rinder wurden anfangs täglich, später in 2 - 3 tägigem Abstand untersucht. Als Antigene dienten bei den Rindern D_4- D_6 die Trypanosoma congolense- Infektionspopulation Tc , sowie die Populationen des ersten und zweiten Parasitämiepeaks Pc_1 und Pc_2; von D_4 außerdem Pc_3. Die Seren von S_4 und S_5 wurden gegen Tc und Pc_2 von D_4 getestet. Antigene für D_7 und D_8 waren die Infektionspopulation Trypanosoma brucei Tb und die Trypanosomen des zweiten Parasitenpeaks Pb_2, für D_7 außerdem das Antigen aus der ersten peak-

Population nach der Superinfektion, Sc_1.

Für den ELISA verwendete ich, entsprechend den Angaben von WILLBERG (1983) ein trypanosomales Gesamtextrakt und ein durch Andauen der Parasiten gewonnenes reines Oberflächenantigen.
Zur Gewinnung des Extraktantigens wurden gewaschene Trypanosomen zunächst durch Einfrieren und Auftauen zerstört. In Anlehnung an die Methode von HUGHES und BALFOUR (1981) mischte ich gleiche Mengen Trypanosomensuspension und 1%iges n-octyl-gluco-pyranosid und beschallte dies 3 x 10 sec mit 50 Watt im Eiswasserbad. Die löslichen Moleküle wurden über Nacht bei 4°C durch Rühren extrahiert, anschließend bei 48000 g 1 Stunde zentrifugiert und der Überstand in ml Portionen bis zur Weiterverwendung eingefroren.

Die Herstellung des Oberflächenantigens erfolgte nach RAUTENBERG, REINWALD und RISSE (1980) durch Trypsinierung. 5×10^8 Trypanosomen in 4,5 ml PSG wurden nach Zugabe von 0,5 ml Trypsin (400 µg/ml PSG) unter vorsichtigem Schütteln bei 30°C inkubiert, die Reaktion nach 10 Minuten mit 0,55 ml Sojabohnen- Trypsininhibitor (800 µg/ml PSG) gestoppt, nach 5 minütigem Zentrifugieren bei 2500 g der abgelöste surface coat im Überstand abgenommen und in ml Portionen lyophilisiert bis zum Gebrauch aufbewahrt.

Den ELISA führte ich als Mikromethode in Anlehnung an VOLLER, BIDWELL und BARTLETT (1975) durch. Den Proteingehalt der Antigene bestimmte ich vor Gebrauch mit der Methode von Folin-Ciocalteau, modifiziert nach LOWRY und Mitarb. (1951).
Als beste Kombination hatte sich in Vorversuchen die Verwendung von Microtiter- Platten der Fa. Dynatech (M 129 A), eine Proteinkonzentration von 10 µg/ml coating buffer für Extraktantigen bzw. 15 µg/ml coating buffer für das Trypsinierungsprodukt, eine Konjugatverdünnung von 1:1000 für

RaB/IgG (heavy and light chains, Fa Cappel, USA) bzw. 1:250 für SaB/IgM (whole molecule, Fa. Paesel, Frankfurt) und die Zugabe von 5- Amino- Salicylsäure als Substrat erwiesen.
Die Beschichtung der Platten erfolgte durch Einpipettieren von je 100 µl der Antigenverdünnung in jede Vertiefung, 3 stündiges Inkubieren bei 37°C in der feuchten Kammer und Aufbewahren über Nacht im Kühlschrank. Zum Gebrauch wurde die Antigenlösung 2 x mit Leitungswasser und 1 x mit $PBS_{7,2}$- Tween 20 ausgewaschen und die Platten trockengeklopft.
Durch Einpipettieren von je 150 µl 0,5%igem HSA- PBS in die erste Lochreihe bzw. je 50 µl in alle folgenden, Zugabe von je 10 µl Serum und entsprechendes Dilutern wurden Verdünnungsstufen von 1:16 - 1:2048 hergestellt. Einer ersten Inkubation über 1 Stunde bei 37°C auf einem Taumelgerät folgten Waschen und Ausklopfen der Platten wie oben.
Nach Zugabe von je 100 µl Substrat wurden die Platten bei Zimmertemperatur 1 Stunde im Dunkeln inkubiert und sofort im Photometer bei 450 nm abgelesen. Auf den Platten führte ich zu Vergleichszwecken je eine Konjugat- Substrat-, Negativ- und Positivkontrolle mit.
In 3 - 4 tägigem Abstand untersuchte ich die Seren aller Rinder gegen die Extraktantigene auf IgM- und IgG-, gegen die Trypsinierungsprodukte nur auf IgM- Antworten.
Dabei dienten für D_4- D_6 wiederum die T. congolense- Infektionspopulation Tc und die 2 bzw. 3 Variantenpopulationen Pc_1- Pc_3, für S_4und S_5 ebenfalls Tc sowie die zwei ersten Variantenpopulationen Pc_1 und Pc_2 von D_4.
Für D_7 und D_8 verwendete ich die T. brucei Infektionspopulation Pb sowie die 2. Variantenpopulation Pb_2, für D_7 außerdem die 1. Superinfektionspopulation Sc_1 sowohl als Extraktantigen als auch als Trypsinierungsprodukt.

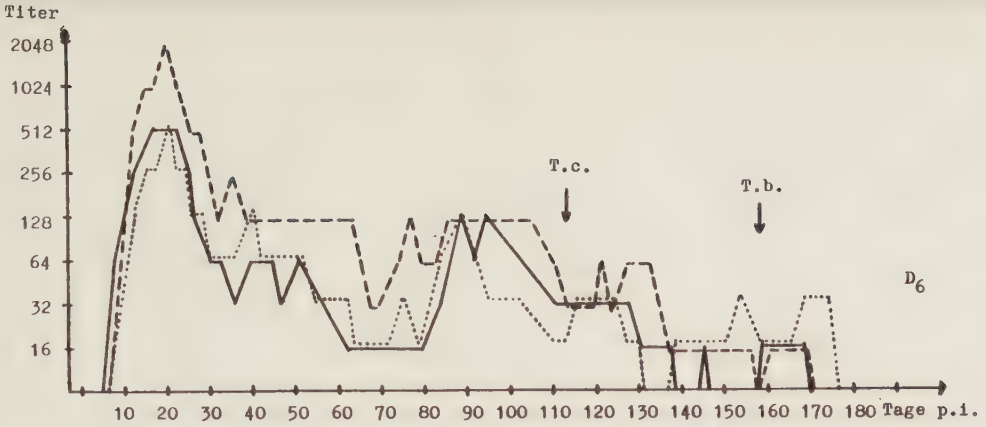
B. Ergebnisse

1. Antikörperreaktionen im IFAT

Generell waren bei den Dahomey- Rindern die immunologischen Reaktionen stärker ausgeprägt als bei den Schwarzbunten. Alle Tiere zeigten innerhalb der ersten Woche p.i. rapide Titeranstiege von IgM und IgG. Bei den Dahomeys waren die präinfektiösen Werte gegen alle Antigene unter dem Grenztiter von 1:16, lediglich D_4 und D_5 wiesen gegen das Antigen der zweiten peak- Population Pc_2 bereits vor der Infektion IgG-Titer von 1:16 bzw. 1:32 auf, D_7 und D_8 gegenüber Pb_2 ebenfalls von 1:16.
Während der gesamten Infektion traten bei beiden Immunglobulinklassen Schwankungen der Serumkonzentrationen auf, allerdings waren sie bei den IgM ausgeprägter.

a) nach einer Erstinfektion

Bei den mit Trypanosoma congolense erstinfizierten Dahomeys D_4- D_6 zeigten alle Tiere zwar prinzipiell ähnliche Immunantworten, doch waren individuelle zeitliche Schwankungen und gewisse Unterschiede für die einzelnen Antigene deutlich erkennbar.
Die IgM- Konzentrationen stiegen innerhalb der ersten beiden Wochen p.i. steil bis auf ein Maximum zwischen dem 11. und 20. Tag p.i. an. Dabei reagierte Pc_1 bei allen Tieren am empfindlichsten; die Titer lagen mit 1:2048 bei D_4 um eine, bei D_5 und D_6 um zwei Stufen über denen gegen die T. congolense-Infektionspopulation Tc (Abb. 1). Mit Tc und Pc_2 wurden bei den drei Rindern Maxima von 1:512 gemessen, nur D_4 erreichte gegen Tc einen kurzen peak von 1:1024, gegen Pc_2 blieben die IgM- Titer dafür mit 1:256 unter denen der anderen Tiere. Titer über 1:512 blieben in der Regel nur sehr kurz bestehen; nach Erreichen der Maximalwerte fielen die IgM- Konzentrationen gegen alle Antigene innerhalb einer Woche 1 - 2 Stufen, um dann langsam, evtl. mit erneuten kurz-



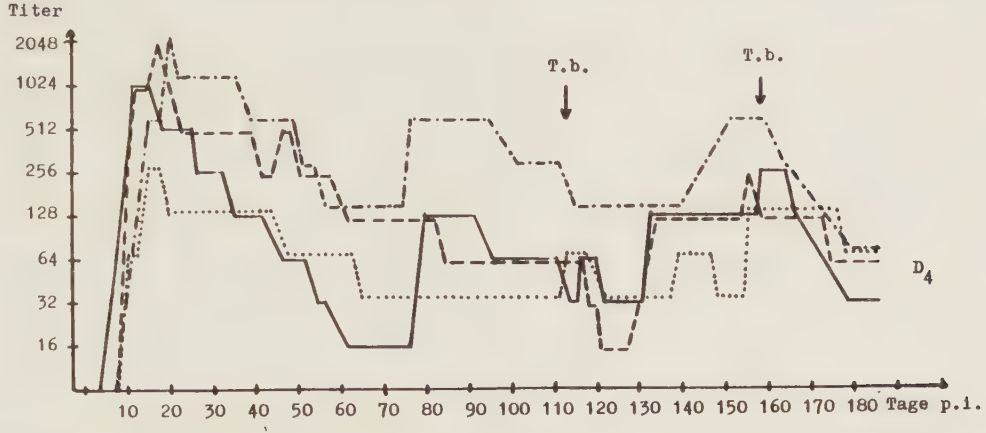


Abb. 1: IgM- Titerverlauf von 2 Dahomeys (D_4, D_6) nach Trypanosoma congolense- Erstinfektion und homologer (T.c.) bzw. heterologer (T.b.) Superinfektion im IFAT

—— Trypanosoma congolense Infektionspopulation, T.c.
– – T. congolense,1.peak-Population,Pc_1 /···· T.congolense,2.peak-Population,Pc_2
–·– T. congolense,späte peak- Population von D_4,Pc_3

fristigen Anstiegen über einen Zeitraum von zwei Monaten auf Titer von 1:16 oder 1:32 abzufallen. Lediglich bei D_4 blieben sie gegen Pc_1 und Pc_3 mit 1:128 noch stärker erhöht.

Nach einer unterschiedlich langen Phase geringer IgM- Konzentrationen (2 Tage - 2 Wochen) stiegen die Titer erneut steil an; dabei wurden zwischen den einzelnen Tieren deutlichere Unterschiede sichtbar. Bei D_5 zeigten die Titer gegen Pc_1 und Pc_2 am 67. Tag kurze peaks von 1:64 bzw. 1:32 und fielen erneut für 1 - 2 Wochen auf 1:16 ab; am 85. Tag p.i. folgte wiederum ein Anstieg um 2 Stufen, der ebenso steil bis zum Tod des Tieres am 91. Tag wieder abfiel. Gegen Tc erreichten die Titer zwischen 69. und 82. Tag p.i. Werte von 1:64, fielen um 1 Stufe und stiegen 2 Tage nach denen gegen Pc_1 und Pc_2 bis zum Tod wieder an.

D_4 und D_6 zeigten ein untereinander relativ ähnliches Bild mit steilen Titeranstiegen um 2 - 3 Stufen zwischen dem 70. und 77. Tag p.i. und zwar bei D_6 gegen alle Antigene, bei D_4 gegen Tc und Pc_3. Daraufhin blieben die Titer entweder einige Zeit plateauförmig erhöht (Tc, Pc_3 bei D_4, Pc_1 bei D_6) oder fielen langsam wieder ab (Tc und Pc_2 bei D_6), (Abb. 1). Am Tage der Superinfektion waren die IgM- Konzentrationen gegen alle Antigene wieder abgefallen.

Bei den Schwarzbunten hatte S_4 Grenztiter von 1:16, bei S_5 waren bereits präinfektiös Werte von 1:64 gegen Pc_2 und 1:128 gegen Tc messbar. S_4 zeigte einen steilen IgM- Anstieg bis zum Maximum 14 Tage p.i. gegen Tc um 3 Stufen, gegen Pc_2 um 5 Stufen (1:512). Nach einem Abfall am 27. und 35. Tag p.i. wurde ein erneuter peak zwischen 44. und 54. Tag p.i. erreicht (Tab. 3).
Bei S_5 erfolgte ein Anstieg um 2 Stufen gegen Tc am 7. Tag p.i., eine Bereniltherapie am 34. Tag führte zu einem Titerabfall auf präinfektiöse Werte. Gegen Pc_2 blieben die Titer zwischen 1:64 und 1:128.

Tag p.i.	Rinder					
	D_4	D_5	D_6	S_4	S_5	S_6
0	-	-	-	16	64	32
2	-	-	-	16	128	16
5	32	32	32	16	128	16
7	64	64	64	32	128	16
12	1024	512	512	128	512	32
17	512	512	512	128	512	-
28	256	256	64	64	256	-
35	128	256	32	64	256	32
40	128	128	64	64	128	-
50	64	64	64	128	128	16
56	32	64	32	64	128	-
63	16	32	16	64	128	32
77	16	64	16	-	-	-
84	128	32	32	-	-	-
91	128	64	64	-	-	-

Tab. 3: Vergleichende Darstellung von IgM- Titern von Dahomeys und Schwarzbunten nach Monoinfektion mit Trypanosoma congolense, gemessen im IFAT mit Tc

Bei den mit T. brucei erstinfizierten Tieren erfolgte ebenfalls innerhalb der ersten Woche p.i. ein rapider IgM- Anstieg. Maxima gegen Tb (Infektionspopulation) wurden von D_8 am 10. Tag p.i. mit 1:1024, von D_7 am 12. Tag p.i. mit 1:512 erreicht (Abb. 2). Die Titer fielen dann stufenweise (bei D_7 stärker schwankend), um nach dem 75.(D_8) bzw. 85. Tag p.i. (D_7) zu verschwinden.
Gegen Pb_2 stiegen sie weniger steil und etwas später an mit Maxima von 1:512 am 20. Tag (D_7) bzw. 1:1024 am 25. Tag p.i. (D_8) und fielen dann bis 1:16 am 83. Tag bei D_8 bzw. unter die Nachweisgrenze am 92. Tag p.i. bei D_7.

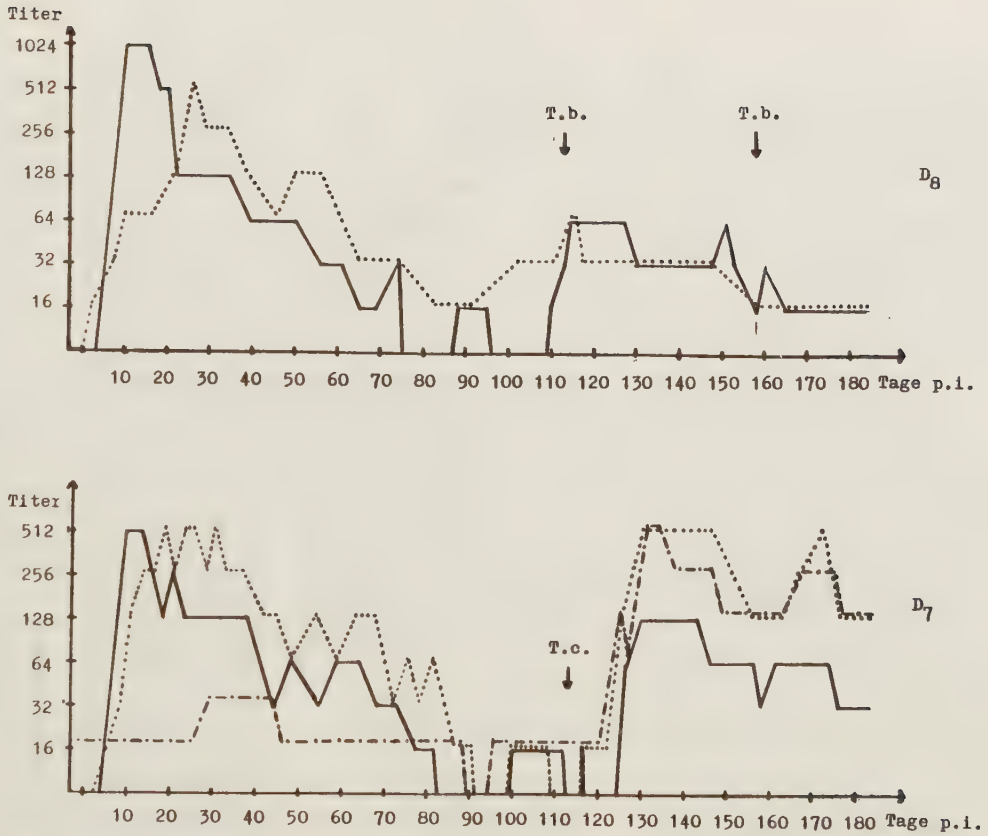


Abb. 2: IgM- Titerverlauf von 2 Dahomeys (D_7,D_8) nach Trypanosoma brucei- Erstinfektion und homologer (T.b.) bzw. heterologer (T.c.) Superinfektion im IFAT

—— Trypanosoma brucei Infektionspopulation, T.b.
– – T. brucei, 1.peak-Population, Pb_1 /··· T. brucei, 2.peak-Population, Pb_2
–·– T. congolense, 1. Superinfektionspopulation von D_7, Sc_1

IgG- Titer gegen T. congolense zeigten bei den Dahomeys steile Anstiege mit Maxima von 1:512 bis 1:2048 zwischen dem 11. (D_4) und 25. Tag p.i.(D_5), fielen innerhalb von 1 - 5 Tagen um 1 - 2 Stufen ab und erreichten 2 Monate p.i. gegen alle Antigene die niedrigsten Konzentrationen (Abb. 3).
Lediglich bei D_4 erfolgte gegen Pc_2 zwischen dem 43.- 52. Tag und bei D_5 gegen Pc_1 zwischen dem 53. und 56. Tag p.i. ein Titeranstieg um eine Stufe. Mit leichten Schwankungen blieben die Werte bis zur Superinfektion unverändert; nur bei D_4 und D_6 stiegen sie gegen Pc_3 bzw. Pc_2 für 4 Wochen auf 1:512 bzw. 1:256 an.

Tag p.i.	Rinder					
	D_4	D_5	D_6	S_4	S_5	S_6
0	-	-	-	32	32	32
5	16	64	32	64	128	16
7	32	512	128	128	128	16
12	512	512	256	128	128	16
15	1024	512	256	128	128	16
17	512	512	512	128	128	-
22	512	1024	512	256	256	16
28	512	2048	512	128	256	-
35	256	512	512	256	256	32
40	256	512	512	512	256	-
50	256	512	512	256	256	16
56	128	256	256	256	256	-
63	128	256	128	256	256	-
69	128	128	128	256	256	32
77	64	128	128	-	-	-
91	64	256	128			

Tab. 4: Vergleichende Darstellung von IgG-Titern von Dahomeys und Schwarzbunten nach Monoinfektion mit Trypanosoma congolense, gemessen im IFAT mit Tc

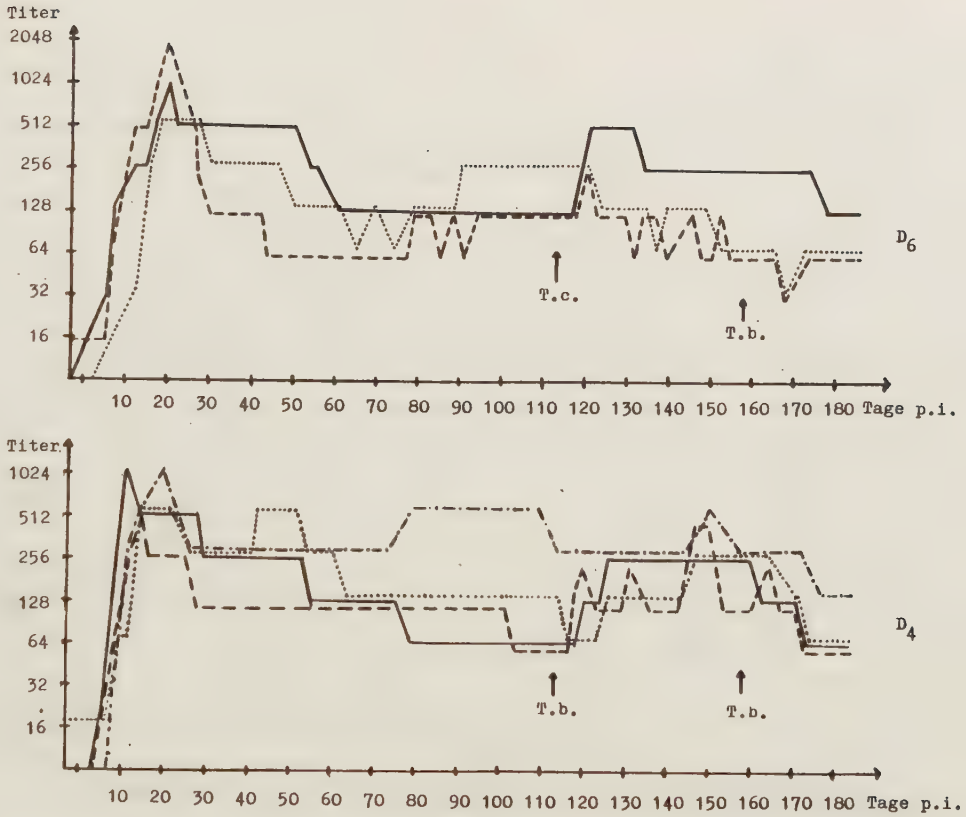


Abb. 3: IgG- Titerverlauf von 2 Dahomeys (D_4,D_6) nach Trypanosoma congolense- Erstinfektion und homologer (T.c.) bzw. heterologer (T.b.) Superinfektion im IFAT

—— Trypanosoma congolense Infektionspopulation, T.c.
- - T. congolense,1.peak-Population,Pc_1 /····T. congolense,2.peak-Population,Pc_2
-·-·T. congolense,späte peak-Population von D_4,Pc_3

Die Reaktionen der Schwarzbunten waren wiederum deutlich geringer ausgeprägt. Titer gegen Pc_2 erreichten früher ein Maximum von 1:256 (4 Stufen) am 14. Tag (S_4) bzw. von 1:512 (3 Stufen) am 20. Tag p.i.(S_5). Gegen Tc Infektionspopulation ergab sich bei S_4 ein zweizipfeliger Titeranstieg am 24. und 54. Tag p.i. Bei S_5 erfolgte ein Anstieg um 2 Stufen über 24 Tage (Tab. 4).

Die IgG- Konzentrationen bei den mit T. brucei erstinfizierten Dahomeys gegen Tb Infektionspopulation stiegen steil auf Maxima von 1:2048 (D_8) und 1:1024 (D_7) am 12. Tag p.i. Gegen Pb_2 reagierten beide Tiere deutlich verschieden (Abb.4). Während bei D_8 einem spät erreichten Maximaltiter (1:512, 5 Stufen) am 39. Tag p.i. ein langsamer, gleichmäßiger Abfall mit Tiefstwerten um den 80. Tag folgte, waren bei D_7 nach einem kurzen peak am 15. Tag (1:2048) und einem folgenden Plateau bei 1:256 zwischen dem 47. und 87. Tag p.i. Titerschwankungen um 2 Stufen messbar. Um den 90. Tag waren dann ebenfalls Tiefstwerte von 1:32 erreicht.

Sowohl die IgG- als auch die IgM- Konzentrationen waren bei D_7 und D_8 (T. brucei) nach 3 Monaten deutlich abgefallen; dagegen traten bei den mit T. congolense infizierten Tieren neuerliche Antikörperpeaks, besonders der IgM, auf.
Bei beiden Globulinklassen war gegen das heterologe Antigen Sc_1 bei D_7 nur ein geringgradiger kurzfristiger Titeranstieg auf 1:32 in den ersten 4 Wochen p.i. zu verzeichnen. Danach blieben die Werte mit 1:16 bis zum Zeitpunkt der Superinfektion unbedeutend erhöht.

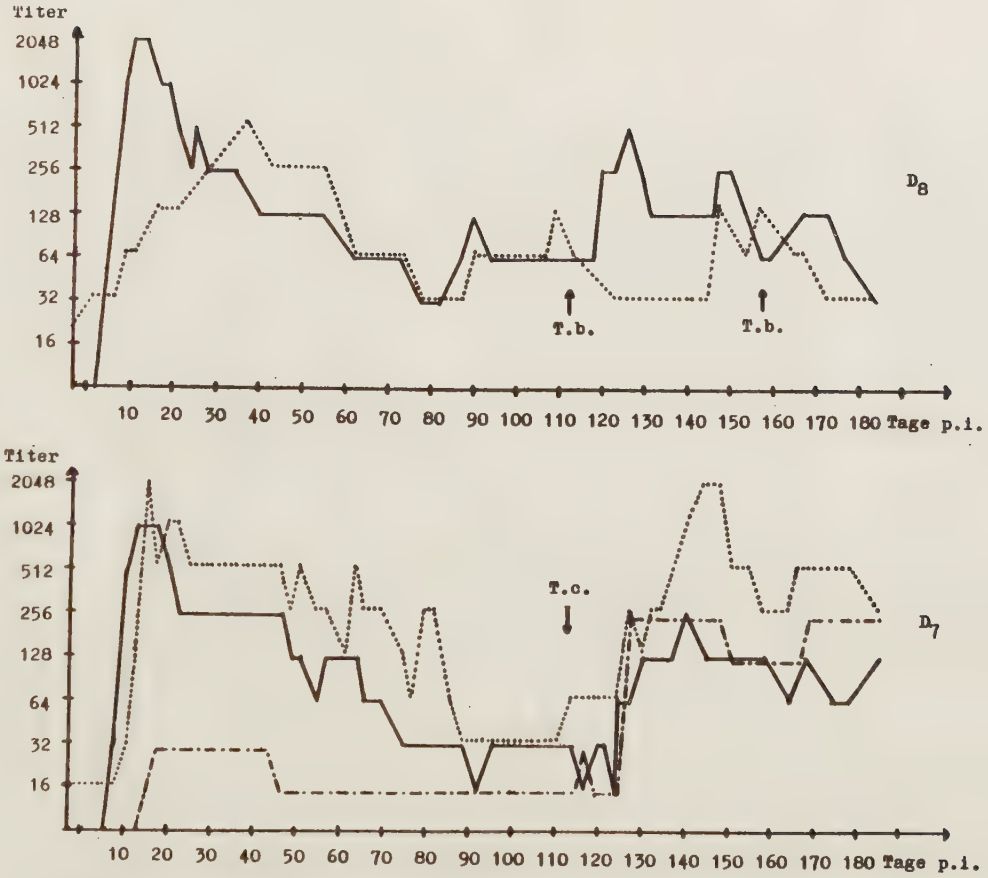


Abb. 4: IgG- Titerverlauf von 2 Dahomeys (D_7,D_8) nach Trypanosoma brucei- Erstinfektion und homologer (T.b.) bzw. heterologer (T.c.) Superinfektion im IFAT

—— Trypanosoma brucei Infektionspopulation, T.b.
- - T. brucei, 1.peak-Population, Pb_1 / ····T. brucei, 2.peak-Population, Pb_2

Bei Dahomeys und Schwarzbunten zeigten die Trypanosomen eine deutliche Randfluoreszenz; bei T. brucei wirkte sie insgesamt dicker und kräftiger. Während der ersten Antikörperanstiege bestanden bei den Antigenen der peak- Populationen Pc_2, Pc_3 und Pb_2 deutliche Unterschiede in der Fluoreszenzstärke innerhalb eines Objektträgerfeldes. Dagegen war sie gleichmässig stark oder schwach, entsprechend den Serumverdünnungen, bei den Infektionstrypanosomen und Pc_1- Antigen. Besonders ausgeprägt erschien dieses Phänomen bei D_5, sowohl bei den IgM- als auch den IgG- Bestimmungen (Tab. 5).

	Tage p.i.								
Titer	7	10	12	15	18	20	25	26	28
1:1024					+	+	+		
1:512		++	++	+	+	+	+	+	
1:256		++	++	++	++	++	++	+	+
1:128		++	++	++	++	++	++	+	+
1:64	+++	+++	++	+++	+++	+++	++	+++	+++
1:32	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
1:16	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

Tab. 5: Unterschiede in der Fluoreszenzstärke einer Trypanosoma congolense- Population (IFAT, IgM)
+++: 100%, ++: 50%, +: 10% der Trypanosomen fluoreszieren stark, die übrigen schwach

Bei D_4 zeigten sich unter Verwendung von RaB/IgG- Konjugat bei Pc_3 während des gesamten Infektionsverlaufs bis zur Superinfektion bei Verdünnung 1:16 bis 1:256 jeweils 50% stark und schwach fluoreszierende Trypanosomen. Bei der Untersuchung mit RaB/IgM- Konjugat trat die 50/50 Fluoreszenz erst ab dem 76. Tag bis zum 113. Tag p.i. auf, sie lag damit genau in dem Bereich einer neuerlich erhöhten IgM- Konzentration, die sich durch einen Anstieg um 2 Titerstufen auswies.

b) Antikörperreaktionen nach einer Superinfektion

Nach einer heterologen Superinfektion mit Trypanosoma brucei bei D_4 behielten die IgM- Titer zunächst ihre abfallende oder gleichbleibende Tendenz bei; im Verlauf von 14 bis 26 Tagen, je nach Antigen, stiegen dann die Konzentrationen deutlich an. Gegen die frühen Antigene Tc und Pc_1 wurden bereits am 17. und 19. Tag Maxima von 1:128 gemessen, gegen die späteren Antigene Pc_2 und Pc_3 erfolgten IgM- Anstiege um 1 - 2 Titerstufen erst nach 4 Wochen.

Eine zweite Superinfektion mit T. brucei am 156. Tag nach der Erstinfektion ließ keine serologisch nachweisbare Reaktion erkennen. Die Titer fielen bis Versuchsende um 1 - 3 Stufen ab, sie waren allerdings zum Zeitpunkt der Drittinfektion noch mit 1:128 bis 1:512 um 2 - 3 Stufen höher als bei der ersten Superinfektion (Abb. 1).

Bei dem mit T. congolense homolog superinfizierten Tier D_6 konnte gegen Pc_2 vom 2.- 10. Tag, gegen Pc_1 vom 8.- 19. Tag p.i. ein Titeranstieg um 1 Stufe gemessen werden. Gegen Pc_1 blieben die Titer im weiteren Verlauf mit 1:16 unbedeutend, gegen Tc und Pc_2 fielen die IgM- Konzentrationen zeitweilig unter die Nachweisgrenze.
Nach einer zweiten, heterologen Superinfektion erfolgte ein kurzfristiger Titeranstieg auf 1:16 und 1:32 gegen Tc am Tag der Infektion, gegen Pc_1 2 Tage und gegen Pc_2 10 Tage p.i. Zu diesem Zeitpunkt waren IgM gegen Tc und Pc_1 bereits nicht mehr nachweisbar, gegen Pc_2 fielen sie dann ebenfalls um den 17. Tag p.i. unter den Grenztiter (Abb. 1).

Bei dem mit T. brucei homolog superinfizierten Tier D_8 wurden ähnliche, kurzfristige Titeranstiege um 1 - 2 Stufen festgestellt, auch bei einer zweiten homologen Superinfektion erfolgte nur eine schwache Reaktion (Abb. 2).

Dagegen zeigte sich bei D_7 nach einer heterologen Superinfektion mit Trypanosoma congolense gegen alle Antigene, gegen die die IgM- Konzentrationen zum Infektionszeitpunkt z.T. unter den Grenztiter gefallen waren, die deutlichste immunologische Antwort. Die Titer stiegen rapide um 4 - 6 Stufen auf Maxima von 1:128 bis 1:512 am 19. Tag p.i. Pb_2 reagierte am sensibelsten, die Titer blieben über 2 Wochen maximal erhöht, fielen dann, wie etwas früher bereits die gegen Tb und Sc_1, ebenfalls um 2 Stufen und erreichten zwischen dem 44. und 54. Tag p.i. Tiefstwerte. In der 8. Infektionswoche trat gegen alle Antigene ein erneuter Anstieg der IgM- Konzentrationen auf. Zu Versuchsende waren die Titer deutlich wieder abgefallen (Abb. 2).

Die IgG- Titer zeigten bei D_4 nach heterologer Superinfektion (T. brucei) gegen alle Antigene Anstiege um 1 - 2 Stufen, gegen Pc_1 4 Tage, gegen Tc 6 Tage, gegen Pc_2 11 Tage p.i. auf 1:256, gegen Pc_3 blieben sie unverändert.
Nach der 2. Superinfektion war nur mit Pc_1 ein kurzer IgG-peak messbar (Abb. 3).
Bei D_6 trat nach homologer Superinfektion (T. congolense) gegen die Tc Infektionspopulation vom 4.- 19. Tag ein Anstieg um 2 Stufen auf 1:512 ein, gegen Pc_1 nur ein kurzer peak (1:256); danach zeigten die Titer gegen alle Antigene, zwischen 1:64 und 1:128 schwankend, abfallende Tendenz bis zum Versuchsende.
Die zweite Superinfektion hatte keine erkennbare Reaktion zur Folge (Abb. 3).
Bei D_7 (heterologe Superinfektion mit T. congolense) zeigten auch die IgG wieder die deutlichste Reaktion. Gegen Tb und Sc_1 erfolgten kurze peaks 2 und 7 Tage p.i., anschließend stiegen die Titer am 10. und 11. Tag p.i. um 4 Stufen gegen Tc und Sc_1 auf 1:256; gegen Pb_2 war ein zweifacher Anstieg um insgesamt 5 Stufen auf 1:2048 am 30. Tag p.i. messbar.

Nach einem Titerabfall in der 5. Woche p.i. blieben die IgG-Konzentrationen, zwischen 2 Stufen schwankend, bis zum Versuchsende erhöht (Abb. 4).

Eine deutliche Reaktion gegen die Tb Infektionspopulation erfolgte nach homologer Superinfektion bei D_8 ab dem 6. Tag p.i. Die Titer stiegen um 3 Stufen auf 1:512 am 14. Tag p.i. Gegen Pb_2 hielt die abfallende Tendenz der IgG- Konzentration an; erst in der 5. Woche p.i. zeigte sich parallel zu einem zweiten peak gegen Tb ein kurzfristiger Anstieg um 2 Stufen. Nach einer zweiten Superinfektion war wiederum gegen beide Antigene eine kurzfristige Titererhöhung messbar (Abb.4).

2. Antikörperreaktionen im ELISA

Im ELISA war es durch die Vielfalt der verwendeten Antigene nicht möglich, mit gleichen Antigenkonzentrationen bei allen Tieren eine gleiche Ausgangssituation zu schaffen; so zeigten sich gegen einige Antigene bereits vor der Infektion Titer von 1:16 bei den IgM- Bestimmungen, unter Verwendung von IgG- Konjugat gegen die späteren Parasitenpopulationen sogar Titer bis 1:64. Da dies jedoch bei allen Tieren gleichermassen auftrat, wurde wegen der erforderlichen Vergleichsmöglichkeiten für die Untersuchungen mit den Trypanosomengesamtextrakten eine allen Antigenen gemeinsame Konzentration von 10 µg Protein/ml coating buffer und für die Trypsinierungsprodukte von 15 µg Protein/ml c.b. zugrundegelegt.
Die erhöhten Ausgangstiter wurden in der folgenden Darstellung jeweils in Relation zu den erfolgten Anstiegen gebracht und zur Vereinfachung nur die entsprechenden Titerstufen angegeben.

Insgesamt waren im ELISA die Titerverläufe der einzelnen Globulinklassen und gegenüber den verschiedenen Antigenen weniger deutlich zu unterscheiden als im IFAT.
Die IgM- Reaktionen wurden sowohl gegen Extrakt als auch gegen Trypsinierungsprodukt gemessen, IgG- Antworten nur gegen Extrakt.

a) Antikörperreaktionen nach einer Erstinfektion

Unter Verwendung des Trypsinierungsproduktes zeigten die mit Trypanosoma congolense erstinfizierten Dahomeys D_4- D_6 schon innerhalb der ersten Woche p.i. steile Titeranstiege um 5 - 7 Stufen mit Maxima, je nach Antigen, zwischen dem 10. und 30. Tag p.i.
Bei D_4 ließ sich eine möglicherweise zeitlich zuzuordnende Staffelung der IgM- peaks gegen die aufeinanderfolgenden Varianten verfolgen.Gegen Tc wurden Maximaltiter am 12. Tag erreicht (7 Stufen), gegen Pc_1 erfolgte ein dazu paralleler Anstieg der IgM- Konzentration mit plateauförmig erhöhten Titern über 4 Wochen (6 Stufen). Am 30. Tag wurde gegen Pc_2 (7 Stufen) und nach 6 Wochen gegen Pc_3 (6 Stufen) ein peak erreicht.
Auch bei D_6 erfolgten gegen Tc und Pc_1 parallele Titeranstiege bis zum 12. Tag p.i.(6 und 5 Stufen); gegen Pc_2 trat ein erster IgM- peak am 22. Tag p.i. auf (6 Stufen), gefolgt von einem höheren in der 7. Woche (7 Stufen). Auch gegen Pc_1 kam es in der 9. Woche p.i. zu einem zweiten IgM- Anstieg (6 Stufen).
D_5 zeigte keine zeitlichen Zusammenhänge zwischen dem Auftreten von IgM- Reaktionen und neugebildeten Varianten. So wurden bereits am 17. Tag Maxima gegen Pc_2 gemessen (6 Stufen), gegen die frühere Variantenpopulation Pc_1 dagegen erst am 28. Tag p.i.(5 Stufen).

Bei allen Tieren ausgeprägt war ein dem Auftreten der Antikörper umgekehrt proportionales Abnehmen der Konzentrationen. So fielen die IgM- Titer gegen Tc am ehesten und stärksten, gefolgt von denen gegen Pc_1; diese blieben allerdings gemeinsam mit denen gegen Pc_2 und Pc_3 (D_4) deutlich erhöht. Nach einer Phase erniedrigter IgM- Konzentrationen (bei D_5 am geringsten ausgeprägt und bei D_6 am stärksten) stiegen die Titer bei D_4 und D_6 im 3. Monat p.i. erneut.

Die Schwarzbunten zeigten die ausgeprägtesten Titerschwankungen gegenüber den einzelnen Antigenen. Einem steilen IgM-anstieg ab dem 5.- 8. Tag p.i. um 6 Stufen bei S_4 und dem 8.-12. Tag um 5 Stufen bei S_5 folgte bei S_4 ein Titersturz um bis zu 6 Stufen ab dem 19. Tag. Nach einem zweiten (gegen Pc_1 und Pc_2) und dritten peak (gegen alle Antigene) am 31. und 38. Tag kam es wiederum zu einem Abfall der IgM- Konzentrationen. Bis zum Versuchsende nach 70 Tagen waren die Titer erneut um 2 - 3 Stufen angestiegen (Abb. 5).

Bei S_5 waren die Schwankungen weniger extrem. Auch ließ sich eine zeitliche Reihenfolge der jeweiligen IgM- Maxima und Minima gegen die nacheinander isolierten Trypanosomenpopulationen, ähnlich wie bei D_4 und D_6, feststellen. Nach einer Berenilbehandlung am 34. Tag p.i., als die Titer um 2 Stufen abgefallen waren, kam es zu erneuten Anstiegen. Ab dem 38. Tag nahmen die IgM- Konzentrationen dann bis Versuchsende kontinuierlich ab, nur mit Pc_1 konnte keine Beeinflussung durch das Therapeutikum bemerkt werden.

Innerhalb einer Woche nach der Erstinfektion mit T. brucei stiegen die Titer auch bei D_7 und D_8, bei D_8 deutlicher ausgeprägt zuerst die gegen Tb Infektionspopulation mit einem Maximum am 12. Tag p.i. (6 Stufen), die gegen Pb_2 am 39. Tag (7 Stufen). Bei D_7 waren 7 Stufen gegen Tb am 12. Tag, gegen Pb_2 am 17. Tag p.i. erreicht (Abb. 6).

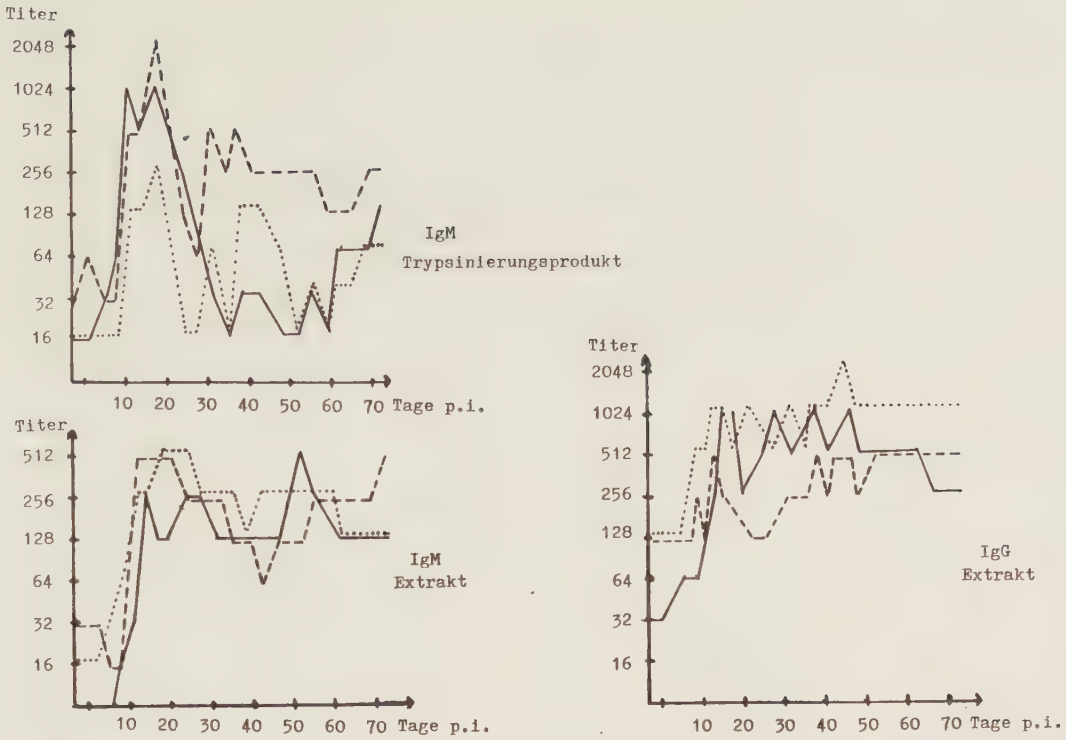


Abb. 5: IgM- und IgG- Titerverlauf eines Schwarzbunten (S_4) nach Monoinfektion mit Trypanosoma congolense, gemessen im ELISA mit Trypsinierungsprodukt (oben) und mit Extraktantigen (unten)

—— Trypanosoma congolense Infektionspopulation
- - T.congolense,1.peak-Population,Pc_1 /····T.congolense,2.peak-Population,Pc_2

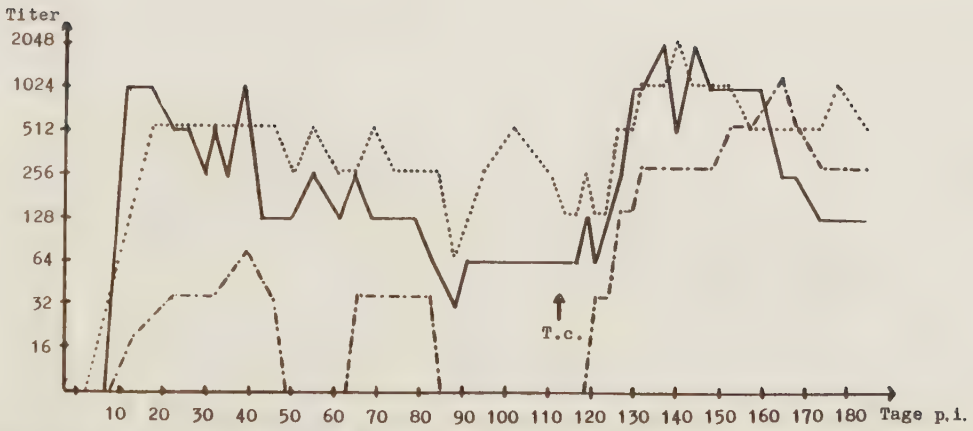


Abb. 6: IgM- Titerverlauf eines Dahomeys (D_7) nach Trypanosoma brucei- Erstinfektion und heterologer (T.c.) Superinfektion im ELISA mit Trypsinierungsprodukt

—— Trypanosoma brucei Infektionspopulation, T.b.
- - T. brucei, 1.peak-Population, Pb_1 / ···· T. brucei, 2.peak-Population, Pb_2
-·-·- T. congolense, 1.Superinfektionspopulation von D_7, Sc_1

Bei beiden Tieren fielen die Titer über den 2. Monat p.i. wieder um 1 - 3 Stufen ab, um zu Beginn des 3. Monats erneute Anstiege (besonders ausgeprägt bei D_7 gegen Pb_2) zu zeigen.
Die Messungen mit dem heterologen Antigen Sc_1 bei D_7 blieben immer um mindestens 2 Titerstufen unter den Werten, die mit den homologen Antigenen erreicht wurden.

Zu den IgM- Nachweisen mit Gesamtextrakt waren keine wesentlichen Unterschiede zu erkennen. Allerdings verhielten sich die Antikörper gegenüber allen Antigenen im allgemeinen relativ gleich, sodaß eine zeitliche Zuordnung von spezifischen IgM zu den jeweiligen Varianten nicht möglich war.
Bei den mit Trypanosoma congolense infizierten Tieren zeigte einzig D_6 einen deutlichen früheren und höheren Titeranstieg gegen Tc als gegen die anderen Antigene; er stellte mit 8 Stufen auch den höchsten überhaupt gemessenen Wert dar (Abb.7).

Bei den Tieren mit T. brucei- Infektionen waren auch mit dem Gesamtextrakt zuerst Maximaltiter gegen Tb mit 6 Stufen am 12. und 17. Tag messbar; gegen Pb_2 traten erste peaks am 22. und 28. Tag p.i. auf.
D_8 zeigte als einziges Tier mit Extraktantigen stärkere Titerschwankungen als mit dem Trypsinierungsprodukt. Dabei verliefen aber die Titer gegen beide Antigenpräparationen prinzipiell ähnlich (Abb. 8).

Die IgG- Reaktionen waren ebenfalls bei den einzelnen Tieren relativ einheitlich gegen alle Antigene mit steilen Titeranstiegen um 4 - 6 Stufen innerhalb der ersten 14 Tage p.i.
Hier zeigte lediglich D_7 einen deutlich abgesetzten früheren IgG- peak gegen die Tb Infektionspopulation.

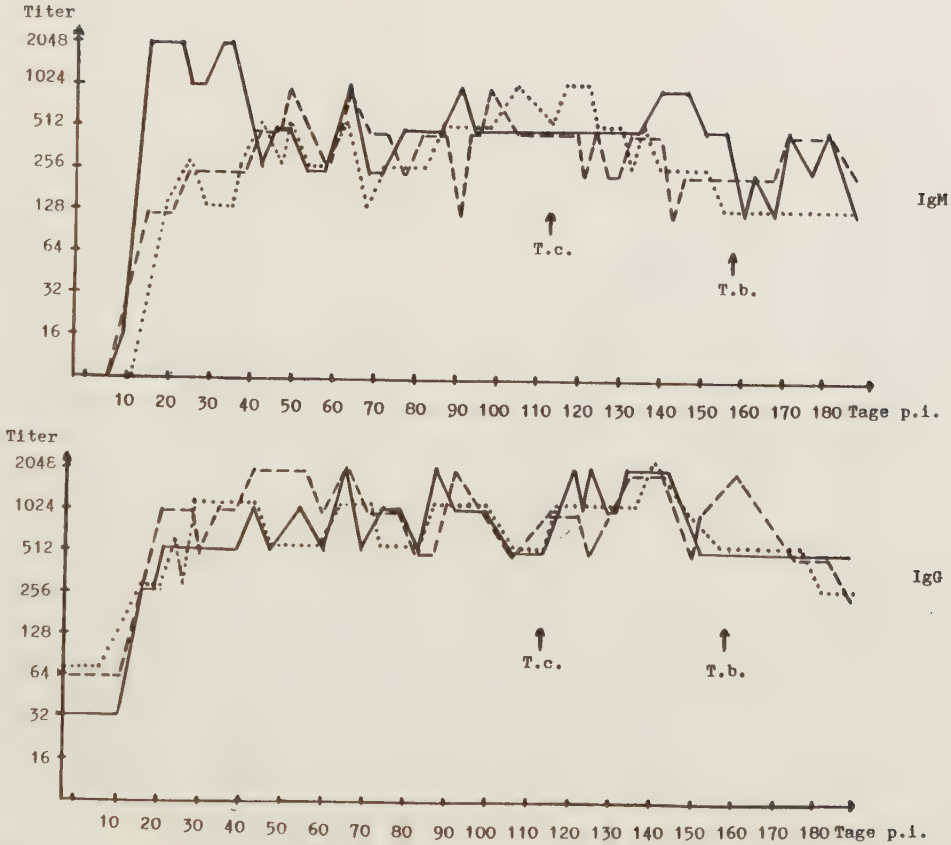


Abb. 7: IgM- und IgG- Titerverlauf eines Dahomeys (D_6) nach Trypanosoma congolense- Erstinfektion und homologer (T.c.) sowie heterologer (T.b.) Superinfektion im ELISA mit Extraktantigen

—— Trypanosoma congolense Infektionspopulation, T.c.
– – T. congolense, 1.peak-Population, Pc_1 /··· T. congolense, 2.peak-Population, Pc_2

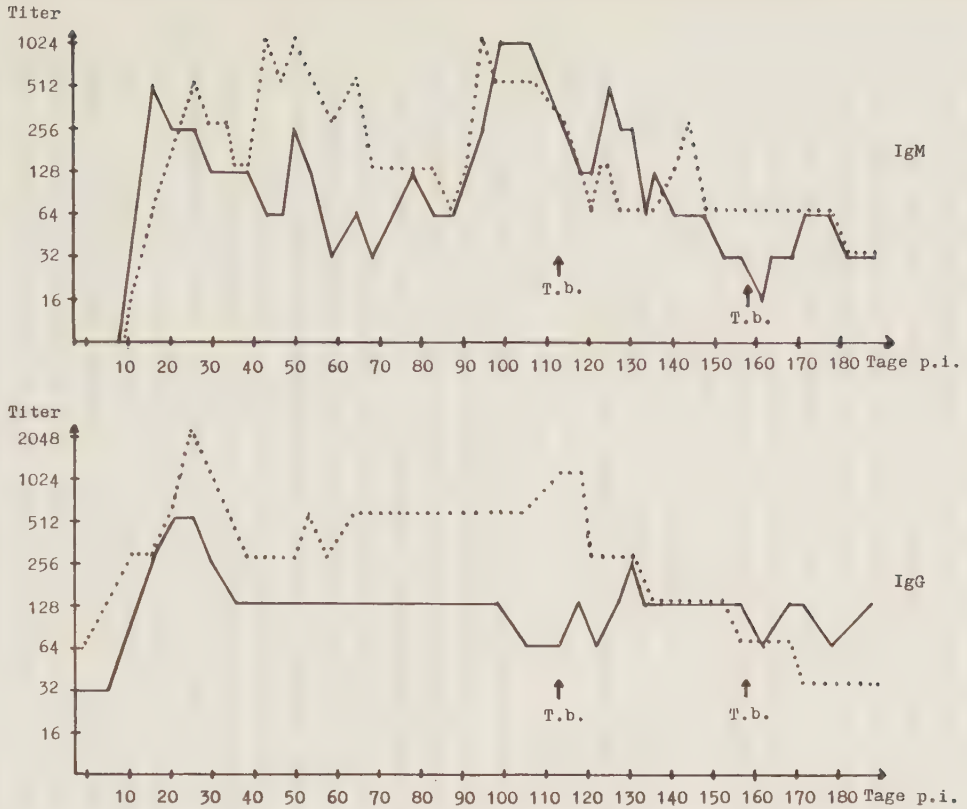


Abb. 8: IgM- und IgG- Titerverlauf eines Dahomeys (D_8) nach Trypanosoma brucei- Erstinfektion und zweimaliger homologer Superinfektion (T.b.) im ELISA (Extraktantigen)

—— Trypanosoma brucei Infektionspopulation, T.b.
- - T. brucei, 1.peak-Population, Pb_1 /···· T. brucei, 2.peak-Population, Pb_2

Bei den Tieren mit T. brucei- Infektionen verliefen die IgG-Titer wesentlich gleichmäßiger als die anhaltend um 1 - 2 Stufen schwankenden der mit T. congolense infizierten Rinder. Auch deutete sich bei D_7 und D_8 eine insgesamt eher abfallende Tendenz der IgG- Konzentrationen (mit Ausnahme der Titer gegen Pb_2 bei D_8) bis zur Superinfektion an (Abb. 8). Bei D_4 und D_6 blieben sie dagegen über den ganzen Infektionszeitraum maximal erhöht (Abb. 7), ähnlich wie auch bei den Schwarzbunten; hier zeigte S_5 nach der Bereniltherapie nur gegen Tc- Antigen schwankungsfreie Titer.

b) Antikörperreaktionen nach einer Superinfektion

Nach einer Superinfektion waren auch im ELISA mit den verschiedenen Antigenen individuell ausgeprägte Reaktionen festzustellen.
Unter Verwendung des Trypsinierungsproduktes zeigten sich in der ersten Woche p.i. Titerzunahmen, bei D_4 nach heterologer Superinfektion mit T. brucei zwar erst ab dem 12. Tag, dann allerdings gleichmäßig um 1 Stufe gegen alle Antigene. Ab dem 34. Tag erfolgten gegen Pc_1- Pc_3 weitere Anstiege um 2 - 3 Stufen. Zum Zeitpunkt der zweiten Superinfektion waren die höchsten überhaupt gemessenen Werte erreicht (7 - 8 Stufen); dies hing möglicherweise mit einer gleichzeitigen respiratorischen Erkrankung zusammen. Bereits 1 - 3 Tage p.i. fielen die IgM- Konzentrationen gegen alle Antigene wieder um 2 - 3 Stufen, gegen Tc nach der Drittinfektion am 8. Tag p.i. ebenfalls um 1 Stufe.
Bei D_6 erfolgte nach homologer Superinfektion (T. congolense) ein zweistufiger Anstieg gegen Tc Infektionspopulation nach 4 Tagen, um 1 Stufe stiegen die Titer gegen Pc_1 und Pc_2 nach 18 Tagen. Einer heterologen Drittinfektion mit T. brucei bei wieder abgefallenen IgM- Konzentrationen folgte gegen Tc ab dem 3. Tag ein breitgezogener Anstieg um 2 Stufen mit einem Maximum am 20. Tag p.i.;gegen Pc_2 wurde am 16. Tag ein kurzer peak gemessen (2 Stufen).

Bei D_8 war nach homologer Zweitinfektion mit Trypanosoma brucei nur gegen die Tb Infektionspopulation ein zweistufiger Anstieg der IgM bis zum 24. Tag nachweisbar; einer Drittinfektion folgte ebenfalls nur gegen Tb ein Anstieg um 1 Stufe.

Die stärkste Reaktion war auch im ELISA bei D_7 nach heterologer Superinfektion mit T. congolense zu verzeichnen. Massive Titeranstiege erfolgten sowohl gegen homologes als auch gegen heterologes Antigen (Abb. 6). Nach kleinem Anfangspeak am 6. Tag stiegen die IgM- Titer gegen Tb und Pb_2 um 5 und 4 Stufen mit Maxima am 24. und 27. Tag p.i.
Gegen die erste Superinfektionspopulation Sc_1 waren ab dem 5. Tag Titer nachweisbar. Sie erreichten am 19. Tag ein erstes Plateau (5 Stufen) und stiegen im 2. Monat nochmals auf insgesamt 7 Stufen an. Gegen Versuchsende zeigten die IgM-Konzentrationen eine abfallende Tendenz.

Mit Extraktantigen gemessene IgM- Reaktionen waren bei D_4 nach der Superinfektion auch mit Tc deutlich nachzuweisen (4 Stufen Anstieg), die Titer gegen die anderen Antigene verliefen ähnlich wie für das Trypsinierungsprodukt beschrieben, nur mit ausgeprägteren Schwankungen.
Bei D_6 erfolgten etwas undeutlichere Reaktionen, allerdings waren die Titer gegen alle Antigene noch maximal erhöht. Nach der Drittinfektion ließen sich gegen Tc und Pc_1 Titeranstiege um 2 Stufen messen.

Etwas geringer als die mit dem Trypsinierunsprodukt gemessenen Titeranstiege waren die gegen Tc- und Pb_1- Extrakt bei D_7 ausgeprägt (2 Stufen). Gegen Sc_1 stiegen sie in 2 Etappen um 4 Stufen mit einem Maximum am 17. Tag p.i.
Deutlicher wiederum waren die Reaktionen mit Extrakt bei D_8; zweistufige Titeranstiege erfolgten gegen Tb in der ersten Woche, gegen Pb_2 nach kurzem Anfangspeak erst in der 4. Woche p.i. Einer zweiten homologen Superinfektion folgte ein breitgezogener Anstieg über 10 Tage (2 Stufen) nur gegen Tb.

Die IgG- Titer mit Extrakt zeigten bei D_4 und D_6 nur undeutliche Schwankungen um 1 - 2 Stufen, allerdings waren sie über den gesamten Infektionszeitraum maximal erhöht geblieben.

Bei D_7 erfolgten gegen Tb ab dem 6. Tag, gegen Pb_2 und Sc_1 ab dem 14. Tag p.i. Titeranstiege um 2 - 3 Stufen. D_8 zeigte nur gegen Tb einen zweistufigen Anstieg der IgG- Konzentrationen mit einem Maximum am 14. Tag p.i., auch nach der Drittinfektion war nur mit Tb eine kurzfristige Reaktion zu verzeichnen.

IV. Besprechung der Ergebnisse

Die Untersuchungen sollten beitragen zur Abklärung der immunologischen Auseinandersetzung von sogenannten trypanotoleranten Dahomey- Rindern, die seit Generationen erregerfrei gehalten wurden, mit Trypanosoma congolense und T. brucei. Dabei wurden die Antikörperreaktionen auf Monoinfektionen sowie homologe und heterologe Superinfektionen untersucht. Als Vergleich dienten schwarzbunte Rinder mit einer T. congolense- Infektion, die den "trypanosensiblen" Rassen zugerechnet werden.
Neben einer Überprüfung der Immunität sollte durch die Verwendung einer klonierten T. congolense- Infektionspopulation die eventuelle antigenetische Variantenbildung durch serologischen Nachweis in IFAT und ELISA verfolgt werden.

Nach einer Erstinfektion mit T. congolense oder T. brucei reagierten alle Rinder sofort mit Zunahmen von IgM- und IgG-Antikörpern, die sowohl mit korpuskulärem Antigen im IFAT als auch mit zwei verschiedenen löslichen Trypanosomenfraktionen im ELISA festzustellen waren.
Während die ersten Antikörper bei allen Tieren, mit gewissen individuellen Unterschieden, noch in der ersten Woche p.i. relativ gleichzeitig auftraten und auch meist nach 1 - 2 Wochen ihre maximalen Konzentrationen erreicht hatten, ließen sich innerhalb des einen sowie zwischen den verschiedenen Testverfahren in der Höhe der Antikörperanstiege, in den relativen Titerzunahmen und in der Dauer nachweisbarer Antikörperkonzentrationen rassebedingte und individuelle Unterschiede erkennen.
HEINRICH (1984) untersuchte an den Tieren verschiedene klinische Parameter; er stellte ebenfalls individuelle Unterschiede, zumindest in Teilbereichen, fest.

Eine positive Korrelation von Parasitämie und Antikörperkonzentrationen wurde von verschiedenen Autoren beschrieben (SCHINDLER und SACHS, 1970; MORRISON und Mitarb., 1982; PINDER und Mitarb., 1982). Dafür sprechen auch die bei den Dahomeys mit dem IFAT erzielten Ergebnisse, besonders die Messungen von IgM- Antikörpern.

Bei allen mit Trypanosoma congolense erstinfizierten Tieren traten 3 - 4 Parasitämiepeaks in den ersten 4 Wochen p.i. auf. D_4 zeigte zu Anfang den stärksten Parasitenschub (3,2 x 10^6/ml Blut) und ebenso die höchsten und langanhaltendsten IgM- Titer (1:1024 bzw. 1:512 über mehr als 4 Wochen). Darauffolgenden langsamen Titerabnahmen mit langen Plateaus auf den einzelnen Stufen läßt sich die geringste Parasitämie zuordnen. Erneute stärkere Parasitenschübe zwischen dem 50. und 70. Tag in einer Phase niedrigster IgM- Konzentrationen wurden durch steile Titeranstiege gegen einen Teil der Antigene beantwortet; danach ließen ausreichende Serumantikörperspiegel kein neuerliches Aufflammen der Parasitämie mehr zu.

Bei D_6 dagegen stiegen und fielen parallel zu einer anfänglich etwas geringer ausgeprägten Parasitämie in den ersten 4 Wochen die IgM stark. Relativ niedrigen und weiter absinkenden Konzentrationen konnten immer höher werdende Parasitenpeaks gegenübergestellt werden. Einem letzten peak am 65. Tag war ein starker Titereinbruch gleichgeschaltet; die folgenden Antikörperzunahmen innerhalb einer Woche verhinderten, ebenso wie bei D_4, neue Parasitämien.
Die IgG- Titer verhielten sich im wesentlichen ähnlich.
D_5 zeigte anfänglich eine Zwischenstellung mit geringeren Titerabfällen, kürzeren Plateaus und weniger häufigen Parasitämiewellen. Ab dem 40. Tag waren starke Titerschwankungen sowohl der IgM als auch der IgG mit neuen Parasitenschüben bemerkbar, einem Trypanosomenpeak ließ sich immer ein Titereinbruch zuordnen; einer starken Parasitenzunahme um den 90.

Tag folgte der Tod des Tieres.
Während also D_4 und D_6 nach einer längeren Auseinandersetzung die Parasiten eliminieren oder zumindest auf nicht nachweisbare Konzentrationen begrenzen konnten, war D_5 offensichtlich nicht in der Lage, den Erreger ausreichend abzuwehren.
Daß nicht ähnlich wie bei den anderen beiden Tieren eine neuerliche starke Antikörperzunahme erfolgte, könnte auf eine Erschöpfung der lymphatischen Organe und damit der Proliferation von antikörperbildenden B - Zellen zurückzuführen sein. Eine anfängliche Anregung und spätere Depression des Immunsystems im Verlauf einer Trypanosomeninfektion wird vielfach berichtet (ASKONAS und Mitarb., 1979; SCOTT und Mitarb., 1977; RURANGIRWA und Mitarb., 1979; CLAYTON und Mitarb., 1979).
Andererseits ist im Zusammenhang mit den starken Antikörper- und Parasitämieschwankungen auch an eine Überschwemmung des Organismus mit abgelösten Parasitenteilen, Immunkomplexen und toxischen Abbauprodukten zu denken (MANSFIELD, 1978; TIZARD und Mitarb., 1978).
Zytotoxisch und endothelschädigend durch Membranzerstörung wirken Phospholipasen, die besonders von T. congolense produziert werden. Zunehmende vaskuläre Permeabilität und Freisetzung vasoaktiver Substanzen (Degranulation von Mastzellen auch in vivo nachgewiesen) führen dann zu einer anaphylaktischen Schockreaktion, die für die afrikanische Trypanosomiasis bereits beschrieben wurde (TIZARD und Mitarb., 1978).
Der histologische Befund mit Lymphknotenhyperplasie, follikulärer Milzhyperplasie und perivaskulären Leberinfiltraten (auch von MORRISON, MURRAY und HINSON, 1982 nach T. congolense- Infektionen festgestellt) einerseits und Lungenödem, Hyperämie von Schleimhäuten, Kapillaren, Leber und Nieren andererseits lassen beide Theorien denkbar erscheinen. Möglicherweise ist auch ein Zusammenwirken der verschiedenen Faktoren für den Tod von D_5 verantwortlich.

Die Tiere mit Trypanosoma brucei Erstinfektionen zeigten nach einem starken Parasitenschub zu Beginn der Infektion keine oder nur geringe Parasitämien. Auch die IgM- Antikörper fielen ohne neuerliche Anstiege nach 2 Monaten bis unter die Nachweisgrenze. Die IgG blieben in geringen Konzentrationen erhalten.

Einen deutlichen Unterschied zu den Dahomeys wiesen die Schwarzbunten nach einer Erstinfektion mit T. congolense auf. Sie zeigten bei den stärksten und anhaltendsten Parasitämien die geringsten Antikörperreaktionen (2 - 4 Stufen unter denen der Dahomeys).
Ein gesteigerter Katabolismus von Serumglobulinen bei T. congolense- Infektionen wurde von NIELSEN und Mitarb. (1978) beschrieben. Auch JENNINGS und Mitarb. (1973) konnten eine Abnahme der Serum HWT von Antikörpern nachweisen.
Die geringeren Immunglobulinkonzentrationen der Schwarzbunten lassen sich daher vermutlich auf unterschiedliche Fähigkeiten zur Antikörperproduktion oder eine mögliche stärkere immunsuppressive Wirkung der Erreger bei den Schwarzbunten zurückführen. BERNHARD, HAASE und GUIDOT (1980) sowie PINDER und Mitarb.(1982) konnten dagegen unter Feldbedingungen in Obervolta keinen Unterschied der Antikörperreaktionen zwischen "trypanotoleranten" und -"sensiblen" Rindern beobachten. Möglicherweise verursacht ein Dauerkontakt auch bei "trypanosensiblen" Rindern verstärkte Abwehrmechanismen.

Eine zeitliche Verschiebung der IgG- Synthese bei den Schwarzbunten konnte in meinen Untersuchungen nicht festgestellt werden im Gegensatz zu WILLBERG (1983), die diesen Befund bei Tieren mit starken Krankheitssymptomen erhob.
Von HEINRICH (1984) wird kein wesentlicher Unterschied in der Klinik der Tiere beschrieben; allerdings zeichneten sich die Dahomeys durch eine schnellere Regenerationsfähigkeit ihres Blutbildes aus. S_5 wurde aufgrund langanhaltender Anämie nach 35 Tagen mit Berenil^R therapiert, nachdem eine ähnliche Krise

bei D_5 dem Tod vorrausging. Bei S_4 war zu Versuchsende nach 70 Tagen noch keine Begrenzung der Parasitämie zu beobachten, sodaß über den Ausgang der Infektion eine endgültige Aussage nicht möglich ist.

Anders als im IFAT werden im ELISA keine Antikörper gegen ganze Trypanosomen erfasst, sodaß eine ähnliche Korrelation zu Parasitenpeaks unwahrscheinlich ist. Vielmehr scheinen die langanhaltenden Titer auf hohe konzentrationen von Parasitenbestandteilen, Zellfragmenten und Proteinstrukturen im Serum hinzuweisen, die auch nach der Eliminierung lebender Parasiten noch länger vorhanden sein können.
Im ELISA zeigten auch die Schwarzbunten relativ hohe, allerdings wiederum unter denen der Dahomeys liegende Titeranstiege. Bei S_5 war nach Berenilgabe gegen die meisten Antigene ein Titeranstieg zu verzeichnen infolge der dadurch gehäuft anfallenden zerstörten Zellen. Im IFAT dagegen blieben die Titer unverändert oder fielen, wie es auch WILSON und CUNNINGHAM (1971) beschrieben. Dies läßt sich mit dem Verschwinden der auslösenden Antigene erklären.

Nach einer ersten Superinfektion waren Unterschiede zwischen den Tieren wohl hauptsächlich auf die Kombination der Erreger von Erst- und Zweitinfektion zurückzuführen.
Relativ ähnlich war die serologische Reaktion der Tiere D_6 und D_8;nach homologer Superinfektion (D_6 mit T. congolense, D_8 mit T. brucei) erfolgten innerhalb der ersten Woche IgM- und IgG-Titeranstiege um 1 - 2 Stufen.
Unter Einbeziehung eines immunologischen Boostereffekts läßt sich dieser Befund eindeutig erklären.
IgM- Antikörper sind die Träger der Primärantwort nach Erstkontakt des Organismus mit einem Antigen und damit, im Falle der Trypanosomiasis, auf neugebildete Parasitenvarianten (SEED und Mitarb., 1969; SEED, 1977; MUSOKE und Mitarb., 1981).
Immunglobuline der G- Klasse dagegen stellen die definitive,

belastbare und langanhaltende Stufe humoraler Immunität dar (ROLLE und MAYR, 1978) und sichern den Wirt gegen das Wiederauftreten gleicher Antigenvarianten im Infektionsverlauf (SEED, 1977; MUSOKE und Mitarb., 1981).
Daß massive Titeranstiege ausblieben, läßt sich einmal mit bereits vorhandenen antitrypanosomalen Antikörpern erklären, andererseits mit einer gesteigerten Bindungskapazität der später gegen dasselbe Antigen gebildeten Immunglobuline (MUSOKE und Mitarb., 1981).

Während sich serologisch zwischen den homologen Superinfektionen mit verschiedenen Erregern kein wesentlicher Unterschied ergab, konnte HEINRICH (1984) bei D_8 nach einer T. brucei-Superinfektion keine neuen Parasitämien nachweisen; D_6 nach T. congolense- Superinfektion dagegen wies einen kleinen peak am 10. Tag p.i. auf.
Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen wäre im Zusammenhang von Lokalisation und Erreichbarkeit des Erregers durch die Antikörper zu suchen. Während T. brucei nachweislich auch im extravaskulären Raum vorkommt, wurde für T. congolense bisher nur die Blutbahn als Aufenthaltsort beschrieben (MOLYNEUX und ASHFORD, 1983). Von SEED (1977) wurde nach passiver Immunisierung von Mäusen der Hauptteil von T. brucei in Lunge und Milz gefunden und nur in geringem Maß im Blut. Ähnliches könnte bei D_8 eingetreten sein; möglich erscheint auch die Eliminierung des Erregers bereits am Ort der Infektion, wogegen T. congolense durch sein ausschließliches Zirkulieren in der Blutbahn nicht schon lokal zu begrenzen war.

Eine heterologe Superinfektion von T. brucei auf T. congolense bei D_4 hatte ebenfalls keine nachweisbare Parasitämie zur Folge; die serologischen Reaktionen waren ähnlich ausgeprägt wie bei den Tieren D_6 und D_8. Vermutlich bestehen zwischen Antikörpern gegen T. congolense und Antigendeterminanten von T. brucei ausreichende kreuzreagierende Bezirke, um eine genügende Eli-

mination des Erregers sicherzustellen. Im anderen Fall hätte eine wesentlich deutlichere Reaktion sowohl der IgM als auch der IgG erfolgen müssen.

Von HÖRCHNER, BOFENSCHEN und ZANDER (1979) wurde eine stärkere Kreuzreaktivität von Trypanosoma congolense- Serum mit T. brucei- Antigen berichtet als umgekehrt. Darin findet sich auch eine mögliche Begründung für die völlig andere Reaktion von D_7 nach einer Superinfektion mit T. congolense auf T. brucei. Parasitologische Befunde und die Anstiege der Antikörper waren ähnlich ausgeprägt wie nach einer Erstinfektion mit T. congolense.
Neben einer geringeren Kreuzreaktivität sind außerdem die wesentlich niedrigeren Antikörperkonzentrationen, im IFAT teilweise unter der Nachweisgrenze, zum Zeitpunkt der Zweitinfektion bei D_7 zu berücksichtigen. Die Titer gegen alle Antigene stiegen innerhalb der ersten Wochen bis zu 6 Stufen an. Dabei erreichten sie gegen das homologe T. congolense- Antigen häufig nur gleiche oder sogar geringere Maximalwerte als gegen heterologe Antigene; die relativen Anstiege waren dafür fast immer höher. T. brucei ließ sich in keinem der parasitologischen Nachweise finden (HEINRICH, 1984).

Von einer Verdrängung von T. brucei durch T. congolense im Verlauf von natürlichen Infektionen wurde durch WILSON und Mitarb. (1975, 1976) berichtet und mit der stärkeren Virulenz von T. congolense begründet. Unter der Berücksichtigung, daß die Virulenz einzelner Stämme derselben Spezies stark differieren kann, scheint eine ähnliche Erklärung für die Reaktion von D_7 dennoch wahrscheinlich.

Die geringen oder ausbleibenden Antikörperanstiege nach einer zweiten Superinfektion wurden bereits beschrieben (MEHLITZ, 1975; LUCKINS, 1977); eine zeitlich nicht festgelegte Immunität nach mehrmaligem Kontakt mit dem Erreger wird dafür verantwortlich gemacht (WILSON, 1971; URQUHART, 1980).

Die zeitliche Abfolge antigenetischer Variantenbildung für Trypanosoma congolense- Infektionen von Rindern wurde von WILSON (1968) mit 10 Tagen angegeben, für T. brucei- Infektionen mit 7 - 10 Tagen (BORST und CROSS, 1982). NANTULYA und Mitarb. (1983) fanden bei T. brucei bereits nach 5 Tagen einen neuen VAT (= Variant Antigen Type) ausgebildet.
Davon ausgehend, daß jeder Parasitämiepeak Ausdruck einer neuen Variante ist, würde auch in unseren Untersuchungen ein Wechsel der VSG's ungefähr alle 10 Tage für T. congolense zutreffen. Entsprechend deutliche Titerschwankungen konnten in keinem der Tests festgestellt werden.
Andererseits erscheint es unwahrscheinlich, daß sich jeder Parasitämiepeak ausschließlich aus Trypanosomen gleicher VAT's zusammensetzt. Von MCNEILLAGE und Mitarb. (1969) wurde an Varianten eines klonierten T. brucei- Stammes antigenetische Heterogenität nachgewiesen.

Auch VAN MEIRVENNE und Mitarb. (1975) stellten an T. brucei-Klonpopulationen einen Hauptantigentyp fest, der vermutlich den der ersten Trypanosomenzelle darstellt, und sich entsprechend häufiger vermehren konnte . Daneben berichteten sie von verschiedenen Neben- VAT's, die entsprechend ihrer Wachstumsgeschwindigkeit im Verlauf der Infektion auftraten.
Wenn in den als Antigenen verwendeten Populationen verschiedene VAT's ausgebildet waren, ist eine unterschiedlich starke Konzentration spezifischer Antikörper je nach der Anzahl der jeweiligen VAT's zu erwarten und damit eine unterschiedlich starke Eliminierung der Erreger (DOYLE, 1977).
Damit ließen sich die verschiedenen Fluoreszenzgrade der Trypanosomen im IFAT erklären; bei den späteren Parasitenpopulationen fluoreszierten die Zellen stärker, die einem VAT angehören, der schon länger der Wirtsabwehr zugänglich ist. Mit neuen VAT's können die Antikörper nur teilweise reagieren, aufgrund kreuzreagierender Determinanten jedoch ausreichend, um serologisch erfasst zu werden.

BARBET und Mitarb. (1982) fanden noch bei einer nach 4-monatiger Passage gewonnenen Population Reaktionen von monoklonalen Antikörpern gegen den Ausgangsklon; allerdings waren deutliche Unterschiede in der Bindungskapazität der Immunglobuline zu verzeichnen.

Im ELISA scheinen die vielen peaks gegen die verschiedenen Antigene ebenfalls auf das Auftauchen neuer VAT's hinzuweisen, die schon in den frühen Populationen vorhanden waren und erst nach massiver Vermehrung eine deutliche Immunantwort hervorriefen.
In Erwägung zu ziehen ist auch das Wiederauftreten derselben Varianten über den ganzen Infektionsverlauf als Erklärung für die Titerschwankungen. Von BORST und CROSS (1982) wird die Reexpression früher VAT's kontinuierlich während der gesamten Infektion angenommen, die aber infolge spezifischer Antikörperreaktionen in immunkompetenten Wirten nicht nachweisbar ist.

Insgesamt erwiesen sich beide Tests und die Antigenpräparationen als hinreichend sensibel, um den Antikörpernachweis bei Rindern nach Erst- und Superinfektionen zu führen; deutlichere Titerverläufe und individuelle Unterschiede, insbesondere auch nach einer Superinfektion, konnten mit dem IFAT gemessen werden.

Eine ausreichende Differenzierung von Antigenvarianten schien in dieser Form nicht möglich. Um die Eignung der Tests sowie der verwendeten Antigene zu prüfen, wäre die Verwendung von monospezifischen Antikörpern angebracht.

V. Zusammenfassung

In drei aufeinanderfolgenden Versuchen wurden 5 Dahomeys und 2 schwarzbunte Rinder mit IFAT und ELISA auf ihre spezifischen IgM- und IgG- Antworten nach experimenteller Trypanosoma- Infektion untersucht. Als Antigene dienten in 1%igem Formalin fixierte Trypanosomen für den IFAT sowie zwei lösliche Proteinfraktionen für den ELISA. Zur Überprüfung einer antigenetischen Variantenbildung wurden ferner von jedem Rind aus den Infektionstrypanosomen sowie aus einigen Populationen der folgenden Parasitämiepeaks Antigene hergestellt.

Nach Erstinfektion mit Trypanosoma congolense oder T. brucei erfolgten bei allen Rindern schon in der ersten Woche Anstiege von IgM und IgG; im Unterschied zu den Dahomeys war bei den Schwarzbunten die Immunantwort wesentlich geringer ausgeprägt.
Zwei homolog superinfizierte Dahomeys zeigten innerhalb einer Woche geringe Zunahmen von IgM und IgG (1 - 2 Titerstufen); ähnliche Ergebnisse brachte auch eine heterologe Superinfektion mit T. brucei auf T. congolense. Dagegen waren Höhe und Dauer der Antikörperanstiege nach einer heterologen Superinfektion mit T. congolense auf T. brucei bei einem weiteren Dahomey den Reaktionen nach einer T. congolense- Erstinfektion vergleichbar.

Insgesamt konnten sowohl individuelle als auch durch den Erreger bedingte Unterschiede in den Antikörperantworten nach Erst- und Superinfektionen festgestellt werden. Eine antigenetische Variantenbildung war nicht eindeutig nachzuweisen.

Bachthaler, E.: Serological investigations in the course of experimental infections with Trypanosoma congolense and T. brucei in Dahomey cattle by means of IFAT and ELISA

Summary

In three successive experiments 5 Dahomey and 2 Friesian cattle were examined for their specific IgM- and IgG- responses to an experimental infection with trypanosomes using IFAT and ELISA. Trypanosomes fixed with 1% formalin served as antigens for the IFAT, two soluble protein fractions were used in the ELISA. To check antigenic variation antigens were produced from the infecting organisms as well as from several populations of the following peak parasitaemias from each cattle.

Rises of IgM and IgG were detected in all cattle in the first week following a primary infection with Trypanosoma congolense or T.brucei. In contrary to the Dahomeys the Friesians developed a far less pronounced immune response.
A homologous superinfection of 2 Dahomeys caused a slight increase in IgM and IgG within one week (1 - 2 dilution grades). Similar results were obtained by a heterologous superinfection with T. brucei succeeding an infection with T. congolense. On the other hand, levels and duration of antibody rises following a heterologous superinfection with T. congolense preceded by an infection with T. brucei were comparable to the reactions following a primary infection with T. congolense.

The differences in antibody responses to primary and superinfections were due to animal variation as well as to the different infecting organisms. Antigenic variation could not definitely be proven.

VI. Literaturverzeichnis

Aaronovitch, S., R.J. Terry (1972): The trypanolytic factor in normal human serum.
Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 66, 344

Allsopp, B.A., A.R. Njogu, K.C. Humphreys (1971): Nature and location of Trypanosoma brucei exoantigen and its relation to 4 S-Antigen. Expl Parasitol. 29, 271-284

Ashkar, T., M. Ochilo (1972): The application of the indirect fluorescent antibody test to samples of sera and dried blood from cattle in the Lambwe Valley, South Nyanza, Kenya. Bull. WHO 47, 769-772

Askonas, B.A., A.C. Corsini, C.E. Clayton, B.M. Ogilvie (1979): Functional depletion of T- and B- memory cells and other lymphoid cell subpopulations during trypanosomiasis. Immunology 36, 313-321

Barbet, A.F., W.C. Davis, T.C. McGuire (1982): Cross- neutralization of two different trypanosome populations derived from a single organism. Nature 300, 453-456

Bernard, S., M. Haase, G. Guidot (1980): Trypanosomose der Rinder in Obervolta, epizootiologische Ermittlungen und Beitrag zum Problem Trypanotoleranz. II. Enzym- Immuntest und indirekte Immunfluoreszenz zum Nachweis von Antikörpern gegen Trypanosomen bei trypanotoleranten und trypanosensiblen Rindern.
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 93, 482-485

Borst, P., G.A.M. Cross (1982): Molecular basis for trypanosome antigenic variation. Cell, USA 29, 291-303

Camargo, M.E. (1966): Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of American trypanosomiasis. Technical modification employing preserved culture forms of Trypanosoma cruzi in a slide test.
Revta Inst. Med. Trop. S. Paulo 8, 227-234

Clayton, C.E., D.L. Sacks, B.M. Ogilvie, B.A. Askonas (1979): Membrane fractions of trypanosomes mimic the immunosuppressive and mitogenic effects of living parasites on the host. Parasite Immunol. 1, 241-249

Cross, G.A.M. (1975): Identification, purification and properties of clone specific glycoprotein antigens constituting the surface coat of Trypanosoma brucei.
Parasitology 71, 393-417

Cunningham, M.P., K. Vickerman (1962): Antigenic analysis in the Trypanosoma brucei group using the agglutination reaction. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 56, 48-59

Diffley, P., B.M. Honigberg (1977): Fluorescent antibody analysis of host plasma components on bloodstream forms of African pathogenic trypanosomes. I. Host specifity and time of accretion in Trypanosoma congolense. J. Parasit. 63, 599-606

Diffley, P., B.M. Honigberg (1978): Immunologic analysis of host plasma proteins on bloodstream forms of African pathogenic trypanosomes. II. Identification and quantitation of surface bound albumin, nonspecific IgG and complement on Trypanosoma congolense. J. Protozool. 64, 674-681

Diffley, P. (1978): Comparative immunological analysis of host plasma proteins bound to bloodstream forms of Trypanosoma brucei subspecies. Infection and Immunity 21, 605-612

Doyle, J.J. (1977): Antigenic variation in the salivarian trypanosomes. In: Immunity to blood parasites of animal and man. Eds. L.H. Miller, J.A. Pino, J.J. McKelvey, Plenum Press, London, 31-63

Gray, A.R. (1960): Precipitating antibody in trypanosomiasis of cattle and other animals. Nature 186, 1058-1059

Greenwood, B.M. (1974): Possible role of a B - cell mitogen in hypergammaglobulinaemia in malaria and trypanosomiasis. Lancet i, 435- 436

Heinrich, H.D. (1984): Der klinische Verlauf von wiederholten Trypanosoma congolense- und T. brucei- Infektionen bei Dahomey- Rindern. Vet. med. Diss., München 1984

Hörchner, F., F. Bofenschen, B. Zander (1979): Zur serologischen Differenzierung von Trypanosoma brucei, T. congolense und T. vivax- Infektionen. Tropenmed. Parasit. 30, 265-273

Houba, V., K.N. Brown, A.C. Allison (1969): Heterophile antibodies, M- antiglobulins and immunoglobulins in experimental trypanosomiasis. Clin. exp. Immunol. 4, 113-123

Hudson, K.M., C. Byner, J. Freeman, R.J. Terry (1975): Immunodepression in experimental African trypanosomiasis. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 63, 273

Hudson, K.M., C. Byner, J. Freeman, R.J. Terry (1976): Immunodepression, high IgM- levels and evasion of the immune response in murine trypanosomiasis. Nature 264, 256-258

Hudson, K.M., C. Byner, R.J. Terry (1976): Possible mechanisms underlying immunodepression by trypanosomes. Parasitology 73, ix A

Hughes, H.P.A., A.H. Balfour (1981): An investigation of the antigenic structure of Toxoplasma gondii. Parasite Immunol. 3, 235-248

Jennings, F.W., P.K. Murray, M. Murray, G.M. Urquhart (1973): Protein catabolism in trypanosomiasis. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 67, 277

Kobayashi, A., I.R. Tizard (1976): Response to Trypanosoma congolense infections in calves. Determination of IgG_1, IgG_2, IgM and C_3 levels and the complement fixing antibody titres during the course of infection. Tropenmed. Parasit. 27, 411-417

Lanham, S.M., D.G. Godfrey (1970): Isolation of salivarian trypanosomes of man and other mammals using DEAE-cellulose. Expl Parasit. 28, 521-534

Lanham, S.M., A.E.R. Taylor (1972): Some properties of the immunogens (protective antigens) of a single variant of T. brucei brucei. J. Gen. Microbiol. 72, 101-116

Latif, B.M.A., K.M.G. Adam (1973): Differentiation of Trypanosoma brucei, T. rhodesiense and T. gambiense by the indirect fluorescent antibody test. Bull. WHO 48, 401-407

Lötzsch, R., G. Deindl (1974): Experimental infection in cattle. III. Indirect fluorescent antibody and complement fixation tests to measure serological responses. Expl Parasit. 36, 27-33

Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall (1951): Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275

Luckins, A.G. (1976): The immune response of zebu cattle to infection with Trypanosoma congolense and T. vivax. Ann. Trop. Med. Parasit. 70, 133-145

Luckins, A.G. (1977): Detection of antibodies in trypanosome-infected cattle by means of a microplate enzyme- linked immunosorbent assay. Trop. Anim. Hlth. Prod. 9, 53-62

Luckins, A. G., D. Mehlitz (1978): Evaluation of an indirect fluorescent antibody test, enzyme- linked immunosorbent assay and quantification of immunoglobulins in the diagnosis of bovine trypanosomiasis. Trop. Anim. Hlth. Prod. 10, 149-159

Mansfield, J.M. (1978): Immunbiology of African trypanosomiasis. Cell. Immunol. 39, 204-210

Masake, R.A., A.J. Musoke, V.M. Nantulya (1983): Specific antibody responses on the variable surface glycoproteins of Trypanosoma congolense in infected cattle. Parasite Immunol. 5, 345-355

Mattern, P. F. Klein, R. Pautrizel, Y.E.J.M. Jongepier- Geerdes (1980): Anti- immunoglobulins and heterophil agglutinins in experimental trypanosomiasis. Infection and Immunity 28, 812-817

McNeillage, G.J.C., W.J. Herbert, W.H.R. Lumsden (1969): Antigenic type of first relapse variants arising from a strain of Trypanosoma (Trypanozoon) brucei. Expl. Parasit. 25, 1-7

Mehlitz, D., G. Deindl (1972): Serological studies on cattle experimentally infected with African trypanosomes. Tropenmed. Parasit. 23, 411-417

Mehlitz, D. (1975): Serologische Untersuchungen zur Subgenus-Differenzierung und zur Antikörperpersistenz nach Trypanosomeninfektionen. Tropenmed. Parasit. 26, 265-275

Molyneux, D.H., R.W. Ashford (1983): African animal trypanosomiasis. In: The Biology of Trypanosoma and Leishmania, Parasites of Man and Domestic Animals, 129-151. Taylor and Francis, London

Morrison, W.I., M. Murray, C.A. Hinson (1982): The response of the murine lymphoid system to a chronic infection with Trypanosoma congolense. II. The lymph nodes, thymus and liver. J. Pathol. 138, 273- 288

Morrison, W.I., S.J. Black, J. Paris, C.A. Hinson, P.W. Wells (1982): Protective immunity and specifity of antibody responses elicited in cattle by irradiated Trypanosoma brucei. Parasite Immunol. 4, 395- 407

Musoke, A.J., V.M. Nantulya, A.F. Barbet, F. Kironde, T.C.McGuire (1981): Bovine immune response to African trypanosomes: Specific antibodies to variable surface glycoproteins of T. brucei. Parasite Immunol. 3, 97-106

Nantulya, V.M., J.J. Doyle (1977): Stabilization and preservation of the antigenic specifity of Trypanosoma brucei variant specific surface glycoproteins by mild fixation techniques. Acta Trop. 34, 313-320

Nantulya, V.M., A.J. Musoke, A.F. Barbet, G.E. Roelants (1979): Evidence for the reappearance of Trypanosoma brucei variable antigen types in relapse populations. J. Parasit. 65, 673-679

Nantulya, V.M., A.J. Musoke, S.K. Moloo, J.M. Ngaira (1983): Analysis of the variable antigen composition of Trypanosoma brucei brucei metacyclic trypanosomes using monoclonal antibodies. Acta Trop. 40, 19-24

Nielsen, K. J. Sheppard, W. Holmes, I. Tizard (1978): Experimental bovine trypanosomiasis. Changes in the catabolism of serum immunoglobulin and complement components in infected cattle. Immunology 35, 817-826

Perié, N.M., T. Tinnemans- Anggawidjaja, D. Zwart (1975): A refinement of the immunofluorescent complement fixation test for trypanosome infections. Tropenmed Parasit. 25, 399-404

Pinder, M., G. Libeau, W. Hirsch, I. Tamboura, R. Hauck-Bauer, G.E. Roelants (1982): Anti- trypanosome specific immune responses in bovine breeds of differing susceptibility to African trypanosomiasis. Centre de Recherches sur les Trypanosomoses Animales (C.R.T.A.) B.P. 454, Bobo- Dioulasso, Republic of Upper- Volta

Politzar, H. (1974): Serological studies on cattle experimentally infected with several species of African trypanosomes. Tropenmed. Parasit. 25, 22-27

Rautenberg, P., E. Reinwald, H.J. Risse (1980): Evidence for concanavalin- A binding sites on the surface coat of Trypanosoma congolense. Parasitology 80, 113-122

Reinwald,E., P. Rautenberg, H.J. Risse (1979): Trypanosoma congolense: Mechanical removal of the surface coat in vitro. Expl. Parasit. 48, 384- 397

Rolle, M., A. Mayr (1978): 5. Grundlagen der unspezifischen und spezifischen Abwehr gegen Infektionskrankheiten. 5.4.3. Humorale Immunität. 52-56 In: Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre, 4. Auflage, Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart

Rurangirwa, F.R., H. Tabel, G.J. Losos, I.R. Tizard (1979): Suppression of antibody response to Leptospira biflexa and Brucella abortus and recovery from immunosuppression after Berenil treatment. Infect. Immun. 26, 822-826

Schindler, R., R. Sachs (1970): Serologische Untersuchungen bei Hunden nach Infektion mit Trypanosoma brucei. Tropenmed. Parasit. 21, 339-346

Scott, J.M., R.G. Pegram, P.H. Holmes, T.W.F. Pay, P.A. Knight, F.W. Jennings, G.M. Urquhart (1977): Immunosuppression in bovine trypanosomiasis: Field studies using foot- and- mouth disease vaccine and clostridial vaccine. Trop. An. Hlth. Prod. 9, 159-165

Seed, J.R., R.L. Cornille, E.L. Risby, A.A. Gam (1969): The presence of agglutinating antibody in the IgM immunoglobulin fraction of rabbit antiserum during experimental African trypanosomiasis. Parasitology 59, 283-292

Seed, J.R. (1974): Antigens and antigenic variability of the African trypanosomes. J. Protozool. 21, 639-646

Seed, J.R. (1977): The role of immunoglobulins in immunity to Trypanosoma **brucei** gambiense. Intern. J. Parasit. 7, 55-60

Sendashonga, C.N., S.J. Black (1982): Humoral responses against Trypanosoma brucei variable surface antigen are induced by degenerating parasites. Parasite Immunol. 4, 245- 257

Soltys, M.A. (1957): Immunity in trypanosomiasis. I. Neutralization reaction. II. Agglutination reaction. Parasitology 47, 375-395

Tabel, H., G.J. Losos, M.G. Maxie, Ch.E. Minder (1981): Experimental bovine trypanosomiasis (T. vivax and T. congolense). III. Serum levels of immunoglobulins, heterophil antibodies and antibodies to T. vivax. Tropenmed. Parasit. 32, 149-153

Takayanagi, T., G.L. Enriquez (1973): Effects of the IgG- and IgM- immunoglobulins in Trypanosoma gambiense infections in mice. J. Parasit. 59, 644-647

Tizard, I., K.H. Nielsen, J.R. Seed, J.E. Hall (1978): Biologically active products from African trypanosomes. Microbiol. Rev. 42, 661-681

Urquhart, G.M. (1980): The pathogenesis and immunology of African trypanosomiasis in domestic animals. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 74, 726-729

Van Meirvenne, N., R. Moors, P.G. Janssens (1972): Serological studies on animals experimentally infected with African trypanosomes. Trans. R. Soc.Trop. Med. Hyg. 66, 333-334

Van Meirvenne, N., P.G. Janssens, E. Magnus (1973): Further studies on the lytic and neutralizing action of human serum on Trypanosoma brucei. Ann. Soc. belge Méd. Trop. 53, 49-56

Van Meirvenne, N., D. LeRay,P.G. Janssens, E. Magnus (1973): Immunogenic properties of common and variable antigens of Trypanosoma brucei. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 67, 274-275

Van Meirvenne, N., P.G. Janssens, E. Magnus (1975): Antigenic variation in syringe passaged populations of Trypanosoma brucei. I. Rationalization of the experimental approach. Ann. Soc. belge Méd. Trop. 55, 1-23

Vickerman, K. (1969): On the surface coat and flagellar adhesion in trypanosomes. J. Cell Sci. 5, 163-193

Vickerman, K. (1978): Antigenic variation in trypanosomes. Nature 273, 291-303

Voller, A.,D.E. Bidwell, A. Bartlett (1975): A serological study on human Trypanosoma rhodesiense infections using a micro- scale enzyme linked immunosorbent assay. Tropenmed. Parasit. 26, 247-251

Weitz, B.G.T. (1960): The properties of some antigens of Trypanosoma brucei. J. Gen. Microbiol. 23, 589-600

Weitz, B.G.T. (1963): Immunological relationships between African trypanosomes and their hosts. Ann. N.Y. Acad. Sci. 113, 400-408

WHO Collaborative Study (1976): Parallel evaluation of serological tests applied in African trypanosomiasis. Bull. WHO 54, 141-147

Willberg, G. (1983): Serologische Untersuchungen an experimentell mit Trypanosoma congolense infizierten Rindern verschiedener Rassen. Vet. Med. Diss., München

Wilson, A.J., M.P. Cunningham, C.D. Kimber (1966): Application of the indirect fluorescent antibody technique to bovine trypanosomiasis. East African Try. Res. Org. Annual Report, 28

Wilson, A.J. (1968): Studies on African trypanosomes. Ph.D. thesis, University of Edinburgh

Wilson, A.J. (1971): Immunological aspects of bovine trypanosomiasis. III. Patterns in the development of immunity. Trop. An. Hlth. Prod. 3, 14-22

Wilson, A.J., M.P. Cunningham (1971): Immunological aspects of bovine trypanosomiasis. IV. Patterns in the production of common antigens. Trop. An. Hlth Prod. 3, 133-139

Wilson, A.J., M.P. Cunningham (1972): Immunological aspects of bovine trypanosomiasis. I. Immune response of cattle to infection with T. congolense and the antigenic variation of the infecting organisms. Expl Parasit. 32, 165-173

Wilson, A.J., J. Paris, F.K. Dar (1975): Maintainance of a herd of breeding cattle in an area of high trypanosome challenge. Trop. An. Hlth Prod. 7, 63-71

Wilson, A.J., J. Paris, A.G. Luckins, F.K. Dar, A.R. Gray (1976): Observations on a herd of beef cattle maintained in a tsetse area. II. Assessment on the developments of immunity in association with trypanocidal drug treatment. Trop. An. Hlth Prod. 8, 1-11

Zwart, D., N.M. Perié, A. Keppler, E. Goedbloed (1973): A comparison of methods for the diagnosis of trypanosomiasis in East African domestic ruminants. Trop. An. Hlth Prod. 5, 79-87.

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Boch danke ich für die Überlassung des Themas und die guten Arbeitsbedingungen.

Herrn Prof. Dr. K. Tempel gilt mein Dank für die Überlassung der Bestrahlungseinrichtungen.

Für ihre freundlichen Ratschläge zur Durchführung meiner Arbeit danke ich Frau Dr. I. Reiter und Herrn Dr. G. Weiland.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts bedanken, ganz besonders bei Frau S. Wegerdt und Frau B. Friedrichs für ihre technische und freundschaftliche Unterstützung bei der Arbeit.

LEBENSLAUF

Name:	Maria Elisabeth Bachthaler
Geburtsdatum:	03. 07. 1958
Geburtsort:	Frankfurt/Main
Vater:	Ernst Bachthaler, Min. Rat BRH
Mutter:	Maria Bachthaler, geb. Hilpert
1964 - 1968:	Besuch der Frankfurt International School, Oberursel/Taunus
1968 - 1976:	Besuch des Gymnasiums, später Gesamtschule, Oberursel
Mai 1976:	Abitur
1976 - 1982:	Studium der Veterinärmedizin an der LMU, München
Feb. 1982:	Staatsexamen
März 1982:	Approbation als Tierärztin
seit Jan. 1983:	Anfertigung der Dissertationsarbeit am Institut für Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie der Tierärztlichen Fakultät der LMU München